

LORENA ELIANNE GRAEF

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO
ANALÍTICO QUANTITATIVO POR ELETROFORESE CAPILAR
PARA TUBERCULOSTÁTICOS DE PRIMEIRA ESCOLHA**

Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção de título de Mestre
em Ciências Farmacêuticas, Curso de
Pós - Graduação em Ciências
Farmacêuticas , Setor de Ciências da
Saúde, Universidade Federal do Paraná

Orientador: Prof. Roberto Pontarolo.

Co-orientador: Prof. José D. Fontana.

CURITIBA

2007

Graef, Lorena Elianne
Desenvolvimento e validação de um método analítico quantitativo por
eletroforese capilar para tuberculostáticos de primeira escolha / Lorena
Elianne Graef - Curitiba, 2007.
xii, 92 f. : il.,

Orientador: Roberto Pontarolo
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor
de Ciências da Saúde, Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de
Insumos e Correlatos
Inclui Bibliografia.

1. Tuberculosis. 2. Eletroforese Capilar. 3. Isoniazida . 4. Rifampicina,
5. Pirazinamida.

I. Pontarolo, Roberto II. Título. III. Universidade Federal
do Paraná.

CDD 614.542

**Dedico este trabalho aos meus pais,
grandes educadores.**

AGRADECIMENTOS

Todas as palavras que conheço são muito pouco, para expressar toda minha gratidão a todos os que participaram desta jornada, mas este é meu humilde reconhecimento:

Aos professores Roberto Pontarolo e José Domingo Fontana, por compartilhar seus conhecimentos estar sempre dispostos a discutir e principalmente por compartilhar vivências e experiências que irão me acompanhar por toda a vida.

Aos professores Fernando Lanças e Emanuel Carrilho, pela utilização das instalações do IQSC e ao Jonathan Cathai que dedicou uma semana do seu tempo para acompanhar os experimentos, tornando possível a conclusão deste trabalho dentro prazo.

Ao Mauricio por ter sido durante esta jornada um grande professor e amigo.

A minhas grandes amigas nesta jornada Lari e Adélia, das quais levarei muito mais que lembranças, uma amizade sincera e a devoção a **Nossa Senhora da Tecnologia**.

Aos amigos do mestrado Christian, Ana Carolina, Joy, Silvia e Andrezza dos quais sentirei muitas saudades. Guardarei na lembrança os momentos difíceis de incertezas que compartilhamos nos corredores da faculdade.

Aos professores Alan, Wanda, Graça, Cid, Almeriane e Kely que sempre tiveram palavras de incentivo e apoio.

A professora Ângela e ao Alan, que dedicaram seu tempo a longas discussões de eletroforese capilar, pela paciência e dedicação desinteressada, muito obrigada.

A todos os professores que participaram da minha formação em especial as professoras Vânia Manfredini de Alcântara e Eleidi Chautard Freire-Maia, que acreditaram e depositaram sua confiança em mim.

Aos técnicos Josí, Gracinha, Geni, Irene e Waleska, sempre muito atentos comigo.

A minha família brasileira, com os quais sei que sempre posso contar. Por cuidar da Maria Fernanda, acompanhar as tarefas do Gabriel e me esperar até altas horas, Márcia, Sandra, Rafa, Vó Zinha, Jarbas, Carmem. Obrigada!

Aos meus pais que me ensinaram tudo que é fundamental na vida, com eles aprendi a estudar e a eles devo tudo que sou. Pela eterna dedicação, por deixarem tantas vezes suas prioridades de lado para atenderem as minhas, mesmo distantes. Papá, mamá muchísimas gracias, los amos con todo mi corazón!!!

À meus irmãos Ivone, Rebeca e Guido, por me ensinar a rir, chorar e dividir, pelo amor incondicional: muito obrigada.

Aos meus filhos por iluminar meus dias com seus sorrisos, e me fazer desejar ser cada día melhor. Amo vocês, vocês são a alegria da minha vida!!!.

A você Dú, companheiro desta jornada e outras tantas, por tua compreensão, companheirismo, paciência e tolerância. Sempre ao meu lado para qualquer desafio. MUITO OBRIGADA!!!!...AMO MUITO VOCE!!!

E principalmente a Deus, por colocar todos vocês no meu caminho e guiar meus passos ao encontro de pessoas tão maravilhosas. Que ele continue guiando e iluminando nossas vidas. Amém.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS E SIMBOLOS.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
2.1 Tuberculose.....	04
2.2 TRATAMENTO DA TUBERCULOSE.....	05
2.3 TUBERCULOSTÁTICO DE PRIMEIRA ESCOLHA.....	05
2.3.1 Rifampicina.....	06
2.3.1.1 Mecanismo de ação.....	07
2.3.1.2 Usos terapêuticos.....	07
2.3.1.3 Efeitos adversos.....	08
2.3.2 Isoniazida.....	08
2.3.2.1 Mecanismo de ação.....	09
2.3.2.2 Usos terapêuticos.....	10
2.3.2.3 Efeitos adversos.....	10
2.3.3 Pirazinamida.....	10
2.3.3.1 Mecanismo de ação.....	11
2.3.3.2 Usos terapêuticos.....	11
2.3.3.3 Efeitos adversos.....	12
2.3.4 Doses fixas combinadas.....	12
2.4 ELETROFORESE CAPILAR.....	14
2.4.1 Princípios.....	15
2.4.1.1 Fluxo eletro-osmótico.....	16
2.4.2 Eletroforese capilar em solução livre.....	19
2.5 VALIDAÇÃO.....	21
2.5.1 Especificidade ou Seletividade.....	22
2.5.2 Linearidade.....	23
2.5.3 Intervalo.....	23
2.5.4 Exatidão.....	23
2.5.5 Precisão.....	24
2.5.5.1 Repetibilidade.....	24

2.5.5.2 Precisão intermediária ou inter-análise.....	25
2.5.5.3 Reprodutibilidade ou precisão inter laboratorial.....	25
2.5.6 Robustez.....	25
3 OBJETIVOS.....	26
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	26
3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 MATERIAL.....	27
4.1.1 Equipamentos.....	27
4.1.2 Vidraria.....	27
4.1.3 Consumíveis.....	27
4.1.4 Reagentes.....	28
4.2 MÉTODOS.....	28
4.2.1 Soluções.....	28
4.2.1.1 Eletrólito de fundo.....	28
4.2.1.2 Solução dos fármacos.....	29
4.2.2 Desenvolvimento analítico.....	30
4.2.2.1 Definição dos parâmetros eletroforéticos.....	30
4.2.3 Validação.....	31
4.2.3.1 Especificidade.....	31
4.2.3.2 Linearidade.....	32
4.2.3.3 Intervalo.....	33
4.2.3.4 Precisão.....	34
4.2.3.4.1 Repetibilidade.....	34
4.2.3.4.2 Precisão intermediária.....	34
4.2.3.5 Exatidão.....	35
4.2.3.6 Robustez.....	35
4.2.4 Adequação do sistema, teor de isoniazida e rifampicina em associação no comprimido.....	36

4.2.5 Comparação com o método por CLAE.....	37
4.2.5.1 Preparo de amostra.....	37
4.2.5.2 Preparo de soluções de referência.....	37
4.2.5.3 Condições cromatográficas.....	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1 CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS.....	39
5.2 OTIMIZAÇÃO.....	40
5.2.1 Escolha do tipo de eletroforese.....	40
5.2.2 Seleção do capilar.....	41
5.2.3 Seleção do Eletrólito de fundo.....	42
5.2.3.1 Composição do eletrólito de fundo.....	45
5.2.3.2 Concentração do eletrólito de fundo.....	46
5.2.3.3 Influência de solventes orgânicos.....	47
5.2.4 Determinação da diferença de potencial.....	48
5.2.5 Pré-tratamento da amostra.....	49
5.2.6 Comprimento de onda.....	51
5.2.7 Pré-condicionamento.....	53
5.2.8 Tempo - volume de injeção.....	54
5.2.9 Utilização do eletrólito de fundo – Reposição.....	54
5.2.10 Cálculo da eficiência.....	55
5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR ECL PARA QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS REALIZANDO LEITURA EM 269,5 nm.....	56
5.3.1 Seletividade.....	56
5.3.2 Linearidade.....	57
5.3.3 Intervalo.....	60
5.3.4 Precisão.....	62
5.3.4.1 Repetibilidade.....	62
5.3.4.2 Precisão intermediária.....	65
5.3.5 Exatidão.....	67
5.3.6 Robustez.....	68
5.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR ECL PARA QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS REALIZANDO LEITURA PARA CADA UM DELES NO SEU COMPRIMENTO DE ONDA IDEAL 269,5; 263,5 e 334,5 nm.....	73

5.5 ADEQUAÇÃO DO SISTEMA, TEOR DE ISONIAZIDA E RIFAMPICINA EM ASSOCIAÇÃO NO COMPRIMIDO.....	77
5.6. COMPARAÇÃO COM MÉTODO POR CLAE.....	78
5.6.1 Cromatografia Líquida de alta eficiência.....	79
5.6.2 Comparação dos resultados obtidos.....	79
6.0 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- Esquema da reação entre rifampicina e isoniazida em meio ácido.....	14
FIGURA 2	- Representação esquemática de um sistema de EC e seu funcionamento.....	16
FIGURA 3	- Esquema mostrando a formação e o sentido do fluxo eletroosmótico.....	17
FIGURA 4	- Gráfico mostrando a variação do fluxo eletroosmótico em função do pH.....	18
FIGURA 5	- Esquema ilustrando as diferenças entre o perfil do fluxo pressurizado e o eletroosmótico.....	19
FIGURA 6	- Resolução para ISN e PYR (série 1) e ISN e RIF (série 2) encontrada para valores de pH iguais a 3,0; 7,0 e 9,0.	42
FIGURA 7	- Resultado do estudo por modelagem molecular (semi-empírico) da estrutura de ISN e PYR, mostrando as cargas parciais de cada átomo dentro do sistema.....	43
FIGURA 8	- Resolução para ISN e PYR (série 1) e ISN e RIF (série 2), encontrada para valores de pH iguais a 8,0; 9,0 e 10.....	44
FIGURA 9	- Representação gráfica dos resultados obtidos para os testes de influência da concentração do eletrólito de fundo (fosfato pH 9,0) na resolução entre PYR-ISN (série 1) e ISN-RIF (série2).....	47
FIGURA 10	- Eletroferograma (a) das concentrações recomendadas pela OMS obtido após corrida eletroforética com fosfato 30 mmol/L a 15 kV; (b) da mistura equimolecular obtido nas condições ideais (Fosfato 40 mmol/L 20 kV).....	49
FIGURA 11	- Espectros de varredura no UV-Vis em tampão fosfato 40 mmol/L pH 9,0 para ISN indicando 263,5 e 269,5 (a). PYR indicando 269 nm (b); para RIF indicando 334,5 e 269,5 nm (c) e sobreposição dos espectros obtidos (d).....	51
FIGURA 12	- Eletroferograma obtido para o placebo (estearato de magnésio, celulose microcristalina e lactose, 1:1:1) (a), placebo contaminado com ISN 60 µg/ ml (b) placebo contaminado com PYR 60 µg/ ml (c) e RIF 90 µg/ ml (d) - leitura realizada em 269,5 nm.....	57

FIGURA 13 - Resultado da avaliação da linearidade do método, para isoniazida com sua respectiva equação da reta e coeficiente de correlação. Leitura realizada a 269,5 nm.....	58
FIGURA 14 - Resultado da avaliação da linearidade do método, para pirazinamida com sua respectiva equação da reta e coeficiente de correlação. Leitura realizada a 269,5 nm.....	58
FIGURA 15 - Resultado da avaliação da linearidade do método, para rifampicina com sua respectiva equação da reta e coeficiente de correlação. Leitura realizada a 269,5 nm.....	59
FIGURA 16 - Representação gráfica dos dados de intervalo obtidos para o método de ECL utilizando solução de padrão de referência USP de isoniazida e comprimento de onda de 269,5 nm.....	60
FIGURA 17 - Representação gráfica dos dados de intervalo obtidos para o método de ECL utilizando solução de padrão de referência USP de pirazinamida e comprimento de onda de 269,5 nm.....	61
FIGURA 18 - Representação gráfica dos dados de intervalo obtidos para o método de ECL utilizando solução de padrão de referência USP de rifampicina e comprimento de onda de 269,5 nm.....	61
FIGURA 19 - Resultados da avaliação da influência da alteração de pH em ± 2 unidades na resolução eletroforética entre pirazinamida e isoniazida (Série 1) e isoniazida e rifampicina (Série 2).....	69
FIGURA 20 - Resultado da avaliação da influência da alteração de temperatura em ± 2 unidades na resolução eletroforética entre pirazinamida e isoniazida (Série 1) e isoniazida e rifampicina (Série 2).....	70
FIGURA 21 - Resultado da avaliação da linearidade do método, com sua respectiva equação da reta e coeficiente de correlação para isoniazida a 263,5 nm	73
FIGURA 22 - Resultado da avaliação da linearidade do método, com sua respectiva equação da reta e coeficiente de correlação para pirazinamida a 269,5 nm	74
FIGURA 23 - Resultado da avaliação da linearidade do método, com sua respectiva equação da reta e coeficiente de correlação para rifampicina a 334,5 nm (c).....	74

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- Elementos requeridos para validação de ensaios.....	21
TABELA 2	- Preparo de soluções teste a partir de soluções mãe (1 mg/ml) dos fármacos: isoniazida, pirazinamida e rifampicina, para avaliação da linearidade.....	32
TABELA 3	- Preparo de soluções teste a partir de soluções mãe (1 mg/ml) dos fármacos: isoniazida, pirazinamida e rifampicina, para avaliação do intervalo.....	33
TABELA 4	- Quantidades dos fármacos adicionadas à matriz de placebo para avaliação da exatidão do método.....	35
TABELA 5	- Estruturas químicas, peso molecular, valores de pKa e considerações teóricas sobre a ionização em diferentes pH da rifampicina, isoniazida e pirazinamida.....	39
TABELA 6	- Valores de tempo, área corrigida e resolução para tampão fosfato tampão borato.....	45
TABELA 7	- Valores de eficiência encontrados para cada fármaco quando presentes em associação equimolecular quantificados por ECL.....	55
TABELA 8	- Resultado da avaliação da repetibilidade: valores de área, tempo, área corrigida e DPR, para isoniazida 60 µg/ml, pirazinamida 60 µg/ml e rifampicina 90 µg/ml.....	63
TABELA 9	- Resultado da avaliação da repetibilidade: valores de área, tempo, área corrigida, resolução e respectivos DPR para os três fármacos em mistura equimolecular 70 µg/ml.....	64
TABELA 10	- Resultado da avaliação da precisão intermediária: valores de área, tempo, área corrigida e DPR, para isoniazida 60 µg/ml, pirazinamida 60 µg/ml e rifampicina 90 µg/ml.....	66
TABELA 11	- Resultado da avaliação da precisão intermediária: valores de área, tempo, área corrigida e DPR, para os três fármacos em mistura equimolecular 70 µg/ml.....	67
TABELA 12	- Valores encontrados para avaliação de exatidão por ensaio de recuperação.....	68
TABELA 13	- Resultados da avaliação de robustez, para variações de ± 2 unidades de pH no EF, sobre os valores de área, tempo, área corrigida e DPR para os fármacos em associação equimolecular.....	71

TABELA 14 - Resultados da avaliação de robustez, para variações de $\pm 2^{\circ}\text{C}$ na temperatura de análise, sobre os valores de área, tempo, área corrigida e DPR para os fármacos em associação equimolecular.....	72
TABELA 15 - Resultado da avaliação da repetibilidade: valores de área, tempo, área corrigida e DPR, para isoniazida 60 $\mu\text{g/ml}$ (263,5 nm), pirazinamida 60 $\mu\text{g/ml}$ (269,5 nm) e rifampicina 90 $\mu\text{g/ml}$ (334,5 nm).....	75
TABELA 16 - Resultado da avaliação da precisão intermediária: valores de área, tempo, área corrigida e DPR, para isoniazida 60 $\mu\text{g/ml}$ (263,5 nm), pirazinamida 60 $\mu\text{g/ml}$ (269,5 nm) e rifampicina 90 $\mu\text{g/ml}$ (334,5 nm).....	76
TABELA 17 - Resultado da avaliação da precisão inter e intra dia: valores de área, tempo, área corrigida e DPR, para isoniazida (50 $\mu\text{g/ml}$) e rifampicina (75 $\mu\text{g/m}$) na DFC.....	77
TABELA 18 - Resultados obtidos para resolução encontrados para os fármacos ISN e RIF presentes no comprimido, e sua respectiva DPR.....	78
TABELA 19 - Resultados obtidos após análise por CLAE: valores de área, área média e DPR de ISN e RIF padrão referência USP (p) e na forma farmacêutica (cpr).....	79
TABELA 20 - Resultados dos parâmetros do método apresentados para validação dos métodos de ECL e CLAE.....	80
TABELA 21 - Resultados encontrados para exatidão e precisão utilizando ECL e CLAE para quantificação de ISN e RIF presentes na forma farmacêutica avaliada.....	81
TABELA 22 - Comparação de tempo e custos relativos por análise utilizando os métodos de ECL e CLAE, para quantificação dos fármacos isoniazida e pirazinamida, quando presentes em associação.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A	- Absorbância
A	- ampère
ADN	- Ácido desoxirribonucleico
AIDS	- Síndrome da imunodeficiência humana adquirida
ANVISA	- Agência nacional de vigilância sanitária
cc	- Concentração
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência
CMV	- Calibração multivariada
CNPq	- Centro nacional de pesquisa e desenvolvimento
cpr	- Comprimido
CV	- Coeficiente de variação
ddp	- Diferença de potencial
DFC	- Doses fixas combinadas
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DP	- Desvio padrão
DPR	- Desvio padrão relativo
EC	- Eletroforese Capilar
ECL	- Eletroforese capilar livre
EF	- Eletrólito de fundo
EPM	- Erro padrão médio
ETB	- Etambutol
FEO	- Fluxo eletroosmótico
HIV	- Vírus da imunodeficiência humana
HPTLC	- Cromatografia em camada delgada de alta eficiência
ISN	- Isoniazida
IUATLD	- International union against tuberculosis and lung diseases
K ₂ HPO ₄	- Fosfato dibásico de potássio
kJ	- quilojoule
kV	- quilovolts
MDR	- Multidroga resistente
MEKC	- Eletroforese capilar micelar
mmol	- milimol
N	- Concentração normal
NaH ₂ PO ₄	- Fosfato monobásico de sódio
NaOH	- Hidróxido de sódio
OMS	- Organização mundial da saúde
OPS	- Organização panamericana da saúde
p	- Padrão
P	- Pressão
PAD	- Arranjo de fotodiodo
PVC	- Polivinilcloridrato
PYR	- Pirazinamida
RIF	- Rifampicina
RMS	- “Root mean square”
RNA	- Acido Ribonucléico
Rs	- Resolução
sol	- Solução
TB	- Tuberculose

t	- Tempo
THF	- Tetrahidrofurano
t _m	- Tempo de migração
Torr.	- Torricelli
Tp.	- Solução tampão
US\$	- Dólar
USP	- United States Pharmacopeia
UV-Vis	- Ultravioleta-Visível
v/v	- Volume em volume
vol.	- Volumétrico
w	- Largura do pico na linha de base

RESUMO

A tuberculose é considerada como a infecção por único agente que mais mata no mundo. A recomendação da OMS para o tratamento da tuberculose é à base de rifampicina (RIF) em associação com outros fármacos, principalmente isoniazida (ISN) e pirazinamida (PYR). A associação de fármacos cria a necessidade de métodos capazes de quantificar os componentes presentes. A eletroforese capilar se apresenta como uma técnica analítica de baixo custo e ecologicamente correta e têm como principais vantagens a diminuição de tempo e custo de análise. Um método por eletroforese capilar livre (ECL), foi desenvolvido para quantificação de RIF, ISN e PYR quando presentes em associação. As condições ótimas encontradas para este método foram: polaridade positiva, utilizando como eletrólito de fundo tampão fosfato 40 mmol/L a pH 9,0; capilar de sílica fundida revestido de poliimida com 64,5 cm de comprimento (56 cm efetivos) e 50 µm de diâmetro interno; a diferença de potencial aplicada de 20 kV, equivalente a uma corrente efetiva de 50 µA, leitura em comprimento de onda de 269,5 nm, com um tempo de análise de 5 min. O método desenvolvido apresentou boa linearidade ($R^2 > 0,999$), precisão inter e intra dia para tempo de migração e área corrigida apropriada (DPR < 2% em ambos os casos), exatidão (próxima a 100%) e robustez dentro dos limites estabelecidos pelas normas internacionais. Parâmetros estes que são semelhantes aos encontrados para métodos de quantificação deste fármaco por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para efetuar uma comparação entre o novo método desenvolvido e o método já estabelecido por CLAE, foram utilizados os comprimidos, utilizados no tratamento da tuberculose no Brasil, os quais apresentam concentração nominal de 100 mg de isoniazida e 150 mg de rifampicina; a quantificação por EC acusou concentrações correspondentes a 95,41 % e 97,3 % do valor nominal para ISN e RIF respectivamente, apresentando precisão com valores de desvio padrão menores a 2%. A comparação de precisão (teste F) e exatidão (teste t), do método desenvolvido com o método proposto por Callieri et al. (2002) utilizando CLAE, mostra que estes possuem exatidão e precisão equivalentes. Sendo assim o método por ECL torna-se uma opção viável para os laboratórios analíticos, sendo mais rápido e econômico que os métodos de determinação simultânea para estes fármacos por CLAE.

Palavras chave: tuberculosis; eletroforese capilar; isoniazida; pirazinamida rifampicina.

ABSTRACT

Tuberculosis is considered the single agent infection that affects more victims in the world. OMS recommendation for the treatment of tuberculosis is based on rifampicine (RIF) in association with other drugs, mainly isoniazide (ISN) and pyrazinamide (PYR). These drug association implies the necessity of methods capable of quantify the components. Capillary Zone electrophoresis (CZE) is one analytical low cost and ecologically correct technique. Their main advantages are time diminishing and low cost analysis. A capillary Zone electrophoresis (CZE) was developed for RIF, ISN and PYR quantification, and it is applied when these components are combined. This method's optimal conditions are: positive polarity, with a buffer bottom phosphate (40mmol/L and pH 9.0) as an electrolyte; melted silica capillary coated with a 64.5 cm layer of polyimida (56 cm effective) with 50 μ m of internal diameter; 20 kV of applied potential, equivalent to a 50 μ A effective flow, 269.5 nm wave length reading, in a 5 min analysis. The developed method revealed good linearity ($R^2 > 0,999$), accurate inter- and intra-day migration time and retified area (DPR < 2% in both cases), exactness close to 100% and robustness inside the international rule limits. These parameters are close to the ones found in this drug's quantification methods in high performance liquid chromatography (HPLC). In order to establish a comparison between the new developed method and the one used in HPLC, pills currently used in tuberculosis treatment in Brazil were used, which nominal concentration is 100mg of isoniazide and 150mg of rifampycine; EZC quantification showed concentrations of 95.41% and 97.3% respectively of the nominal value for ISN and RIF, presenting precision with values lesser than 2% on shunting line standard. The comparison of precision (test F) and exactness (test t) between the developed method with the one proposed by Callieri et al. (2002) using HPLC, shows that they have equivalent exactness and precision. Thus, the EZC method becomes a viable option for the analytical laboratories, being faster and more economic than simultaneous determination methods for these drugs by HPLC.

Keywords: tuberculosis; capillary electrophoresis; isoniazide; pyrazinamide; rifampicine.

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose humana é uma doença infecto contagiosa, causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*. No passado a tuberculose foi responsável por milhões de mortes. A introdução da quimioterapia e medidas profiláticas reduziram drasticamente o número de mortes, esta situação se manteve por algumas décadas até que a tuberculose (TB) voltou a ser considerada como a infecção por único agente que mais mata no mundo (DUCATI et al., 2006).

O ressurgimento da TB se deve, principalmente, à pandemia da infecção por HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana). O HIV alimenta a epidemia de TB (OMS, 2002). É possível dizer então que a infecção por HIV mudou drasticamente a história epidemiológica da TB provocando um aumento na transmissão, morbidade e mortalidade (DUCATI et al., 2006).

No Brasil estima-se que 200 mil indivíduos estejam co-infectados com TB/HIV (DUCATI et al., 2006) colocando o Brasil entre os 22 países que concentram 80% dos casos de TB no mundo; entre noventa e noventa e cinco mil casos novos e seis mil óbitos são registrados todo ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Os dados mundiais estimam que, sem tratamento, 50% dos doentes vão a óbito em menos de cinco anos, sendo que a maioria não atinge os dezoito meses (CHIN, 2001).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) a forma de contrariar o efeito adverso do HIV na epidemia de TB é o aumento da eficácia no diagnóstico precoce e a maximização das taxas de sucesso do tratamento, de forma a interromper a transmissão da doença (OMS, 2002). A OMS recomenda a utilização de múltiplos fármacos em associação, visando minimizar a aparição de cepas resistentes (OMS, 2002); surgem assim os fármacos de doses fixas combinadas ou DFC que compreendem as associações de dois ou mais tuberculostáticos em uma única formulação, com a finalidade de aumentar a adesão ao tratamento, reduzir os riscos de resistência, diminuir os custos do tratamento, reduzir erros de administração medicamentosa e simplificar o manuseio e a distribuição destes fármacos (AGRAWAL et al., 2002).

A associação dos fármacos traz vantagens terapêuticas, mas gera novos desafios para a indústria farmacêutica, a estabilidade dos fármacos na associação e a dificuldade analítica para sua quantificação. Surge assim a necessidade de

métodos capazes de quantificar os fármacos, em formas farmacêuticas compostas (associação de dois ou mais fármacos).

Desde o início da década de 90 têm sido desenvolvidos diferentes métodos para quantificar pirazinamida, isoniazida e rifampicina quando associados em diferentes formas farmacêuticas. Um dos primeiros métodos para quantificação destes fármacos em associação foi proposto por Gaitonde e Pathak (1991) utilizando cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC) para separação e posterior quantificação por densitometria. Cinco anos mais tarde, em 1996 Argekar *et al.* desenvolveram o primeiro método utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com esta finalidade. Em 1999, Goicochea e Olivieri desenvolveram um método utilizando espectrometria por calibração multivariada. No mesmo ano, Ellard *et al.* propuseram uma análise colorimétrica. Em 2002, Calleri *et al.*, apresentaram um novo método por CLAE, utilizando gradiente de fase móvel. Contudo a Farmacopéia Americana (United States Pharmacopeia, 2002), na monografia da associação, propunha, até janeiro deste ano (2007), uma quantificação em duas etapas; quantificando primeiro a rifampicina e finalmente a isoniazida e a pirazinamida, utilizando CLAE com colunas diferentes (United States Pharmacopeia, 2002); a partir de então, a quantificação oficial dos três fármacos, quando presentes em associação, passa a ser por CLAE, utilizando uma mesma coluna, detector de UV e gradiente de fase móvel, o tempo total desta análise é de 15 min (United States Pharmacopeia, 2006).

Alguns autores, ao comparar métodos analíticos, apontam à eletroforese capilar (EC), como uma alternativa viável para a substituição da CLAE (PRADO *et al.*, 2005), pois quando comparadas, apresenta vantagens como diminuição no consumo de solventes, no pré-tratamento da amostra e no tempo de análise, apresentando ainda maior simetria de picos, eficiência e seletividade, mantendo a precisão e a exatidão (ALTRIA, 1996).

Fatores como: baixo custo das colunas (capilares) (WATSON, 1999), facilidade operacional, análise de amostras aquosas e não aquosas e separação de enantiômeros (VEUTHEY, 2005) também são citadas como vantagens da eletroforese capilar na literatura. Acedo-Valenzuela *et al.* em 2002 propuseram a primeira análise por eletroforese capilar, para associação de tuberculostáticos (rifampicina, isoniazida e pirazinamida), mas utilizando eletrocromatografia micelar

(MEKC). A proposta deste trabalho é desenvolver um método analítico quantitativo para estes fármacos por eletroforese livre, simplificando o máximo possível o pré-tratamento de amostra, visando facilidade operacional e diminuição de custo e tempo de análise.

Os fármacos para tratamento da TB são fornecidos gratuitamente pelo Governo Federal, qualquer contribuição para diminuição do custo de produção e do controle de qualidade destes fármacos, permitirá que um número maior de indivíduos tenha acesso ao tratamento, contribuindo para diminuir a disseminação da TB.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. TUBERCULOSE

A tuberculose (TB), também conhecida como praga branca é uma doença infecto contagiosa causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, parasita facultativa intracelular, cuja infecção inicial costuma ser assintomática (WARREN, 1997). A doença pode se apresentar como tuberculose pulmonar ou em outras formas extra-pulmonares, sendo a forma pulmonar a mais freqüente no mundo. Noventa a noventa e cinco por cento dos indivíduos infectados entram inicialmente em uma fase de latência existindo o perigo permanente de reativação (CHIN, 2001). Deficiências nutricionais como silicosis, câncer, diabetes mellitus, *HIV* (vírus da imunodeficiência humana) e tratamento com imunossupressores, são alguns fatores que aumentam a susceptibilidade à doença (WARREN, 1997).

O HIV alimenta a epidemia de TB, por aumentar o desafio imunológico da população em geral, quer esteja ou não infectada pelo HIV (OMS, 2002). Em muitos países a TB vem emergindo como a doença oportunista mais comum associada à infecção por HIV (BLOOM, 1994). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que até 2020, 200 milhões de indivíduos estarão infectados e 70 milhões morrerão de TB, a maioria nos países em desenvolvimento (OMS, 2003 a).

O índice de fatalidade por TB é de 23% mas passa dos 50% em alguns países africanos com altos índices de HIV; 32% da população mundial está infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis*; a co-infecção deste com HIV chega aos 18% (DYE, 1999.); 35% dos casos de TB pulmonar em mulheres e crianças pode ser atribuído à co-infecção com HIV (BRAUN et al., 1991).

Em alguns países da África sub-sahariana 70% dos casos de TB pulmonar são HIV positivos e cerca de 50% das pessoas convivendo com HIV/AIDS desenvolvem TB, e esta pode exercer um efeito adverso na progressão do HIV; assim o tratamento da tuberculose e sua prevenção deve ser uma das preocupações prioritárias dos programas HIV/AIDS (OMS, 2002).

2.2 TRATAMENTO DA TUBERCULOSE

A recomendação da OMS para o tratamento da TB é à base de rifampicina (RIF) em associação com outros fármacos, principalmente isoniazida (ISN), pirazinamida (PYR) e etambutol (ETB), chamados de tuberculostáticos de primeira escolha (OMS; 2002). A justificativa para utilização de múltiplos fármacos é que o *Mycobacterium* se torna resistente espontaneamente, mas apresenta diferentes tempos de mutação para cada fármaco. Cada cavidade ou tubérculo formado possui 10^9 microorganismos, o índice de mutação é de 1 em 10^{14} , assim é virtualmente impossível que o *M. tuberculosis* se torne resistente a mais de um fármaco em pacientes corretamente tratados (RILEY, 1993).

O tratamento pode ser dividido em duas fases: uma fase inicial intensiva com associação de três ou quatro dos fármacos citados por um período de dois meses, seguido de uma fase final de manutenção com associação de dois fármacos por quatro meses (OMS; 2002).

No Brasil, estima-se que o custo de tratamento por paciente em 2006 foi de US\$ 732 sendo que o governo contribui com 85% dos custos totais no controle de TB. A OMS coloca o Brasil como 16º do ranking mundial, segundo o número de casos informados por ano (OMS, 2005).

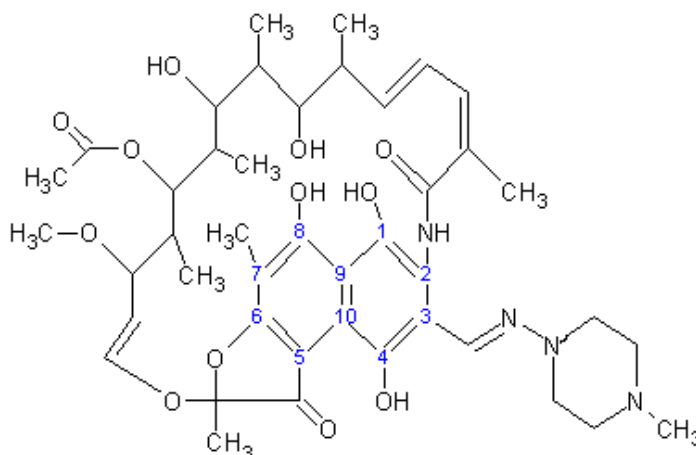
2.3 TUBERCULOSTÁTICOS DE PRIMEIRA ESCOLHA.

Os fármacos utilizados no tratamento da tuberculose podem ser divididos em duas categorias principais. Os de primeira escolha, isoniazida, pirazinamida, rifampicina e etambutol são os principais, e combinam o máximo de eficácia com um grau aceitável de toxicidade. Os tuberculostáticos de segunda escolha são capreomicina, estreptomicina, canamicina, cicolserina, etionamida e ácido aminossalicílico, que são reservados para o caso de fracasso terapêutico, microorganismos multidroga resistentes (MDR) e para os casos de TB extra pulmonar ou toxicidade medicamentosa (KODA-KIMBLE et al., 2005).

Isoniazida e rifampicina são os dois fármacos mais ativos; sendo que a combinação destes cura de 95-98% dos casos de TB causados por cepas

susceptíveis. A adição de pirazinamida à combinação de isoniazida e rifampicina por um período de dois meses, permite reduzir o tempo de tratamento de nove para seis meses, sem perda de eficácia (KATZUNG, 1998).

2.3.1 Rifampicina (RIF)



A rifampicina é um fármaco semi-sintético, derivado da rifamicina B, esta molécula é caracterizada por conter uma cadeia alifática formando uma ponte entre duas posições não adjacentes de um núcleo aromático. Sua fórmula química é $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$; possui peso molecular de 822.95 g/mol; seu nome oficial é 3-[[[(4-metil-1-piperazinil)imino]metil]rifamicina. Apresenta-se como um pó cristalino, vermelho alaranjado. Pouco solúvel em H_2O e acetona, solúvel em acetato de etila, metanol, tetrahidrofurano (THF) e facilmente solúvel em clorofórmio e DMSO. Apresenta absorção máxima em 237, 255, 334 e 475 nm (0,002 mg/mL em tampão fosfato pH 7,4). Suas suspensões de 1% em água apresentam pH entre 4,5 a 6,5. Possui dois valores de pka, sendo o primeiro de 1,7 referente à hidroxila da posição quatro, e o segundo de 7,9 referente ao N três da piperazina. Suas soluções em DMSO são muito estáveis, em quanto que as soluções em H_2O são pouco estáveis. (MERCK, 2000; United States Pharmacopeia, 2006). A degradação da Rifampicina é pH dependente, em meio ácido hidrolisa formando 3-formilrifamicina, que apresenta atividade *in vitro*, mas não *in vivo*, e em contato com ar em meio alcalino oxida a

rifampin quinona, também inativa (SHISHOO, et al., 1999). Não suporta altas temperaturas e deve ser armazenada ao abrigo da luz (MARTINDALE, 2002).

2.3.1.1 Mecanismo de ação

Pertence ao grupo dos antibióticos macrocíclicos complexos; que possui ação bactericida para microorganismos intra e extracelular (MANDEL; PETRI, 1996). Inibe o crescimento da maioria das bactérias Gram-positivas assim como de numerosos organismos Gram-negativos (MANDEL; PETRI, 1996), pois inibe a síntese de RNA bacterial por forte ligação à subunidade β da RNA-polimerase ADN-dependente de micobacterias e outros microorganismos; desta forma a enzima não inicia a transcrição de RNA (United States Pharmacopeia, Drug Information, 2003). Em altas concentrações também inibe a RNA-polimerase ADN-dependente e as transcriptases reversas virais (MANDEL; PETRI, 1996).

Algumas bactérias apresentam resistência a qual pode ser definida por uma mutação próxima ao gene *rpoB* ou por mutação na bomba de efluxo da micobactéria (IGLESIA; MORBIDONI, 2006).

2.3.1.2 Usos terapêuticos

É utilizada principalmente em combinação com ISN e PYR, como um componente da terapia com múltiplos fármacos no tratamento da tuberculose e com dapsona e clofazimina no tratamento da hanseníase. É componente de vários regimes de tratamento de infecções oportunistas por micobacterias.

No tratamento da tuberculose, para crianças a recomendação é de 10 a 20 mg/kg, em dose única ou de duas a três vezes por semana dependendo do regime de tratamento (United States Pharmacopeia, Drug Information, 2003); enquanto para adultos e adolescentes a dose usual é de 600 mg/dia em dose única por todo o período de tratamento ou 10 mg/kg, com um máximo de 600 mg, duas a três vezes por semana, dependendo do regime adotado. A dose máxima recomendada é de

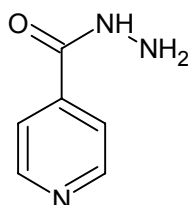
900 mg, pois doses maiores aumentam a ocorrência de efeitos colaterais (MARTINDALE, 2002).

2.3.1.3 Efeitos adversos

De forma geral é bem tolerada, sendo que menos de 4% dos pacientes desenvolvem reações adversas significativas (MANDEL; PETRI, 1996) quando ocorrem, são mais freqüentes em terapias intermitentes ou após retorno a uma terapia interrompida (MARTINDALE, 2002).

Síndrome semelhante ao resfriado, hipersensibilidade, discracias sangüíneas, hepatite e nefrite intersticial, são efeitos que precisam de atenção médica especial; distúrbios gastrintestinais e infecções fúngicas, se persistentes, requerem atenção médica, enquanto coloração avermelhada ou marrom dos fluidos corporais, enxaquecas e ataxia são sintomas freqüentes que não precisam de atenção médica (United States Pharmacopeia, Drug Information, 2003). Por ser um potente indutor das enzimas microssômicas hepáticas, acelera o metabolismo de vários fármacos provocando uma redução da meia vida plasmática dos mesmos, pode também provocar imunossupressão, mas não há evidências de que este efeito seja deletério em pacientes aos quais é administrado o fármaco (MANDEL; PETRI, 1996).

2.3.2 Isoniazida (ISN)



A isoniazida é a hidrazida do ácido isonicotínico, descoberta em 1945 por Chiorine (MANDEL; PETRI, 1996). Sua fórmula química é $C_6H_7N_3O$, possui peso

molecular de 137,14 g/mol, sua nomenclatura oficial: 4-hidrazida ácida piridincarboxilica. Apresenta-se como um pó cristalino branco, solúvel em água, ligeiramente solúvel em etanol e praticamente insolúvel em éter e benzeno. Suas soluções em água a 1% possuem pH de 5,5 a 6,5. Apresenta valores de pKa de 2,0 e 3,5. É pouco estável em H₂O e muito estável em DMSO. Possui absorção máxima em 266, 265 nm (0,01 mg/mL em HCl 0,01N) (MERCK, 2000; United States Pharmacopeia, 2006). É incompatível com açúcares e deve ser armazenado ao abrigo da luz (MARTINDALE, 2002).

2.3.2.1 Mecanismo de ação

É um agente bactericida sintético notavelmente seletivo para micobactérias. Possui ação bacteriostática para o bacilo semidormente e bactericida para os microorganismos em rápida divisão (MANDEL; PETRI, 1996). A concentração tuberculostática mínima é de 0,0025 a 0,005 µg/mL; são necessárias concentrações superiores a 500 µg/mL para que o crescimento de outros microorganismos seja inibido (United States Pharmacopeia, Drug Information, 2003).

Parece atuar pela inibição da síntese de ácido micólico, componente essencial da parede celular das micobactérias, o que explicaria sua elevada seletividade sobre este tipo de bactérias (TAKAYAMA et al., 1975). Temeis et al., sustentam que metabólitos da isoniazida inibem enzimas chaves na respiração da micobactérias aumentando seu poder bactericida (TIMMINS et al., 2004).

Os microorganismos desenvolvem resistência bacteriana a ISN rapidamente (MANDEL; PETRI, 1996); provavelmente o mecanismo de resistência está relacionado a uma mutação sem sentido no interior do gene *inhA* micobacteriano, que codifica a NADH-desidrogenase, alvo molecular da ISN, envolvido na biossíntese do ácido micólico. Outro possível mecanismo é a mutação do gene que codifica a catalase peroxidase, responsável pela ativação da ISN (IGLESIA; MORBIDONI, 2006).

Cerca de 1 em 10⁶ bacilos da tuberculose é geneticamente resistente à ISN, como as cavidades tuberculosas podem conter até 10⁷ a 10⁹ microorganismos, não é de estranhar que o tratamento com ISN isoladamente possa provocar seleção das

bactérias resistentes (MANDEL; PETRI, 1996). Este é o motivo da administração de múltiplos fármacos associados durante o tratamento da tuberculose (MARTINDALE, 2002).

2.3.2.2 Usos terapêuticos

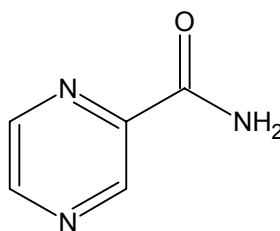
É o fármaco mais utilizado mundialmente para o tratamento da tuberculose pulmonar e extra pulmonar (MANDEL; PETRI, 1996). É indicado na primeira fase do tratamento e no período de manutenção do regime curto de tuberculose (MARTINDALE, 2002). Pode ser utilizada em terapias intermitentes com doses de 10 mg/kg, três vezes por semana ou 15 mg/kg, duas vezes por semana, segundo recomendação da OMS (United States Pharmacopeia, Drug Information, 2003). A dose usual é de 300 mg para adultos e de 5 a 10 mg/kg/dia para crianças, com um máximo de 300 mg/dia, por via oral ou intramuscular.

2.3.2.3 Efeitos adversos

Podem aparecer diversas anormalidades mentais durante o uso deste fármaco; as reações mais proeminentes foram: exantema cutâneo, febre, icterícia e neurite periférica. A incidência de hepatite é de 0,3% em adultos, mas pode chegar a 2,6% em indivíduos com disfunções hepáticas, idosos ou alcoólatras. Pode causar convulsões em pacientes com distúrbios convulsivos. As contrações musculares, tontura, ataxia, parestesias, torpor e encefalopatia tóxica, que podem ser fatais, constituem outras manifestações da neurotoxicidade da ISN.

A Piridoxina deve ser administrada (15 a 50 mg/dia) em conjunto com ISN para minimizar seus efeitos tóxicos, principalmente em pacientes desnutridos e/ou que possuam predisposição a neuropatias (United States Pharmacopeia, Drug Information, 2003).

2.3.3 Pirazinamida (PYR)



Foi descoberta durante a investigação de análogos da nicotinamida. É um análogo pirazínico sintético da mesma; sua fórmula química é $C_5H_5N_3O$, seu peso molecular é de 123,11 g/mol, seu nome oficial é pirazinacarboxiamida. Apresenta-se em forma de cristais brancos. É ligeiramente solúvel em água pouco solúvel em etanol e muito pouco solúvel em éter. Suas soluções aquosas são neutras. Apresenta valor de pKa de 0,50 para a base conjugada (BH^+). Possui absorção máxima em 269 nm (MERCK, 2000).

Chis et al. (2005), comprovaram a existência de pontes de hidrogênio intra e inter moleculares, possuindo as intermoleculares características de ligação com predominância eletrostática.

2.3.3.1 Mecanismo de ação

Seu mecanismo de ação é desconhecido, mas sabe-se que pode atuar como bacteriostático ou bactericida. É efetiva em $pH \leq 5,6$. Salfinger, Crowle e Reller (1990) propuseram que o responsável pela atividade antibacteriana da Pirazinamida é o ácido pirazinóico, o qual é formado pela ação da enzima pirazinamidase, sintetizada pelo bacilo. A formação do ácido combinada com o ingresso do bacilo ao macrófago abaixariam o pH até níveis tóxicos para o mesmo (MARTINDALE, 2002). O ácido pirazinóico também depleta a energia reserva da membrana (WADE; ZHANG, 2004).

Estudos mostram que em condições anaeróbias, a pirazinamida possui maior ação frente ao *M. tuberculosis*, pois as ATPases e complexos de enzimas respiratórias inibem o aumento da atividade da PYR sob condições de oxigenação normais, mas não sob condições anaeróbias (WADE; ZHANG, 2004).

2.3.3.2 Usos terapêuticos

É um importante componente da terapia com múltiplos fármacos para a TB, principalmente nas oito semanas iniciais. A dose recomendada pela OMS é de 25 mg/kg/dia ou 35 mg/kg, duas vezes por semana ou 50 mg/kg, três vezes por semana (MARTINDALE, 2002).

A dose usual para adultos é de 15 a 30 mg/kg/dia (máximo de 3 g/dia) ou 50 a 70 mg/kg, duas ou três vezes por semana (máximo 4 g/dia ou 3 g/dia respectivamente) dependendo do regime adotado. Para crianças a dose máxima usual é de dois mg/kg, quando administrada diariamente ou 3 g por dose, três vezes por semana ou 4 g por dose, duas vezes por semana dependendo do regime utilizado (United States Pharmacopeia, Drug Information, 2003).

2.3.3.3 Efeitos adversos

A lesão hepática constitui o efeito colateral mais comum e mais grave da pirazinamida, sendo dose dependente. O fármaco inibe a excreção de urato, com conseqüente hiperuricemia, podendo precipitar ataques agudos de gota; indivíduos diabéticos podem apresentar maior dificuldade no controle da glicemia. Destacam-se também astralgias, náuseas e vômitos, anorexia, disúria, mal estar e febre; foto sensibilidade e exantema podem ocorrer mais raramente (MARTINDALE, 2002 e United States Pharmacopeia, Drug Information, 2003).

2.3.4 Doses fixas combinadas

Doses fixas combinadas ou DFC é a denominação para associação de dois ou mais tuberculostáticos de primeira escolha, sendo estes, rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol, em proporções fixas em uma única forma farmacêutica; possui como principais vantagens: redução do risco de resistência; menor risco de erros de medicação; melhor adesão do paciente; redução de custos de tratamento; simplifica o manuseio e a distribuição.

A OMS recomenda o uso de DFC como rotina no tratamento de TB e os coloca na lista de medicamentos essenciais. Países como o Brasil, possuem baixos índices de resistência e utilizam como protocolo DFC já há algum tempo (PATCHANGULA et al., 2004).

A OMS e a *International Union Against Tuberculosis and Lung Diseases* (IUATLD) exigem que a biodisponibilidade da rifampicina nas DFC seja equivalente à biodisponibilidade da mesma nas formas farmacêuticas individuais (SINGH et al., 2001).

Os problemas associados à qualidade das DFC estão atualmente em foco, principalmente os relacionados à baixa biodisponibilidade da rifampicina e instabilidade da formulação (BHUTANI et al., 2005). Existem várias justificativas para estes problemas: alteração da forma cristalina da rifampicina, adsorção do fármaco pelos excipientes, ordem de adição dos fármacos, decomposição na formulação e decomposição no estômago (SINGH et al., 2001).

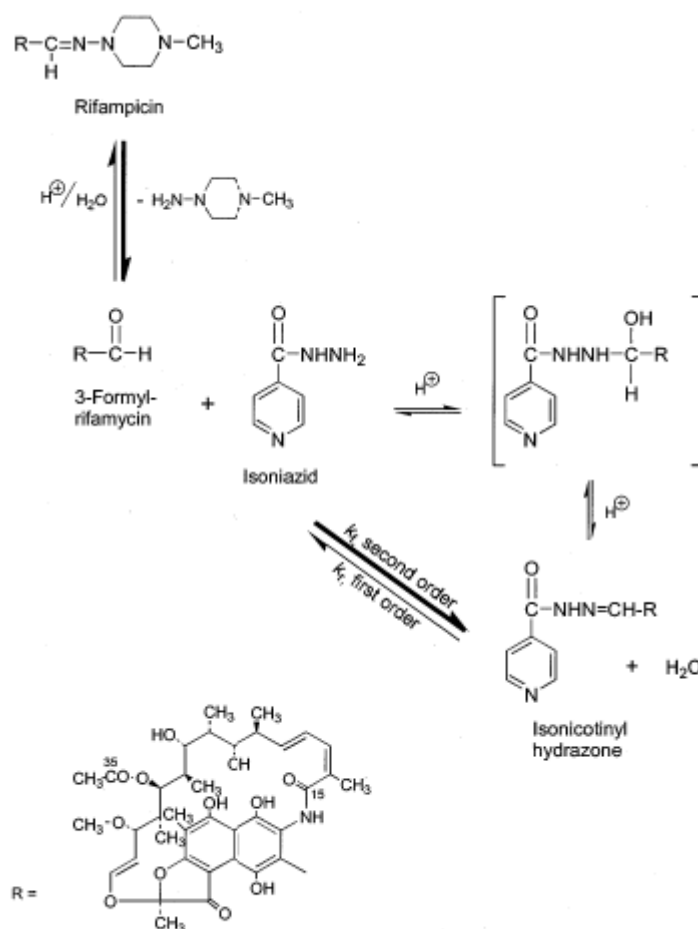
A decomposição na formulação já é bem conhecida: a rifampicina em pH ácido hidrolisa a 3-formilrifamicina, esta hidrólise em presença de Isoniazida é duas vezes mais rápida (SHISHOO et al., 1999).

Como mostra a Figura 1, a 3-formilrifamicina reage com isoniazida para formar isonicotinil hidrazona (HYD); estudos recentes mostram que esta reação pode ocorrer na formulação mesmo na forma sólida (SINGH et al., 2001).

A pirazinamida e o cloridrato de etambutol atuam como catalisadores desta reação, mediante a transferência intramolecular de um próton, por um mecanismo tetraédrico (BHUTANI et al., 2005).

Seja qual for o motivo, a baixa biodisponibilidade da rifampicina nas formulações, leva ao fracasso do tratamento e ao aparecimento da resistência, agravando o quadro (SHISHOO et al., 1999).

FIGURA 1: Esquema da reação entre rifampicina e isoniazida em meio ácido



FONTE: SINGH et al., 2001.

2.4. ELETROFORESE CAPILAR

O termo eletroforese refere-se à migração de espécies eletricamente carregadas, quando dissolvidas ou suspensas em um eletrólito através do qual passa uma corrente elétrica. A utilização de capilares como canais de migração em eletroforese aumentaram o desempenho da separação eletroforética, comparável ao da CLAE. Este método é comumente conhecido como eletroforese capilar (EC) (United States Pharmacopeia, 2002).

A habilidade de obter alta eficiência de separação por aplicação de diferença de potencial através de um capilar (ALTRIA, 1999), foi introduzida em 1981, por Jorgenson e Lukacs (ANDRADE; CUSTODIO, 2005). Por ser ecologicamente mais correta e mais econômica (VEUTHEY, 2005) é a técnica de separação de mais rápida expansão em análises farmacêuticas (WATSON, 1999), gradualmente se estabelece como uma técnica alternativa e de suporte para CLAE (ALTRIA, 1999). EC já é utilizada na rotina em análises farmacêuticas, forenses, clínicas e ambientais, mas sua utilização tornou-se mais evidente com o projeto genoma humano e o sequenciamento de proteínas (ALTRIA, 2004).

2.4.1 Princípios

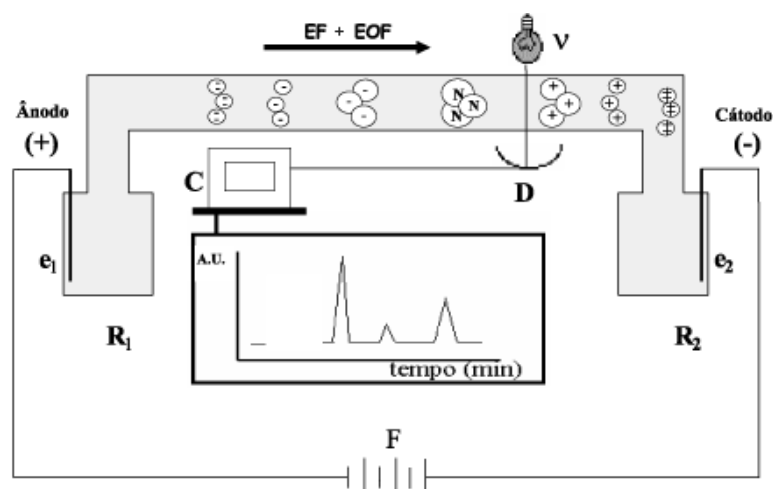
O processo de separação se dá pela aplicação da voltagem, de tal forma que cátions migram para o pólo negativo (cátodo) e ânions para o pólo positivo (ânodo), e partículas neutras não são atraídas para nenhum dos pólos (United States Pharmacopeia, 2002), (Figura 2).

A mobilidade eletroforética de uma espécie química é em geral determinada pelo seu tamanho e número de cargas dos íons e pode ser calculada segundo a relação:

$$\mu E = (q/6\pi) / \eta r$$

Onde μE = mobilidade eletroforética; q = carga, η = viscosidade da solução e r = raio do íon.

FIGURA 2: Representação esquemática de um sistema de EC e seu funcionamento.



. FONTE: QUEIROZ; JARDIM, 2005.

Onde F representa a fonte de energia; e_1 e e_2 os eletrodos, R1 e R2 os reservatórios contendo eletrólito de fundo, v uma lâmpada de emissão com frequência conhecida, D o detector, C o computador ou analisador, EF força eletroforética.

Hipoteticamente, para separar íons com diferentes cargas e tamanhos, o menor e de maior carga sairá antes. A velocidade eletroforética, depende da diferença de potencial aplicada, seguindo a seguinte relação:

$$v = \mu E$$

Onde v = velocidade do íon E = ddp aplicada (volts/cm) (ALTRIA, 1996).

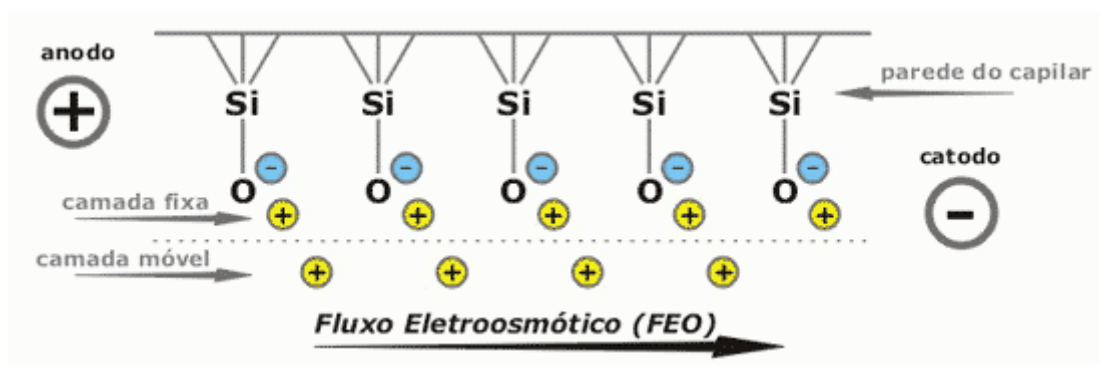
A mobilidade de um íon pode ser influenciada pelo seu valor de pK_a , assim quanto mais ionizado maior será sua mobilidade, por este motivo a manipulação do pH tem um efeito marcante na mobilidade relativa dos íons (WATSON, 1999).

O fator mais importante na separação por EC é o Fluxo eletro-osmótico.

2.4.1.1 Fluxo eletro-osmótico

Este fluxo ocorre pela ionização dos grupos silanois da sílica (parede dos capilares) quando em contato com solução tampão. A valores de pH muito altos, estes grupos dissociam resultando em cargas negativas (grupos silanoatos) na superfície (ALTRIA, 1996). Os grupos silanoatos atraem íons carregados positivamente provenientes do tampão, que formam uma camada interna de cátions (camada fixa) perto da parede do capilar. Estes cátions não são suficientes para neutralizar todas as cargas negativas, assim, uma segunda camada de cátions é formada (camada móvel). Quando uma tensão é aplicada, a camada móvel é puxada no sentido do cátodo. As moléculas de água que solvatam o analito também contribuem para o deslocamento deste ao longo do capilar. Esta força, responsável pelo transporte das espécies iônicas ao longo do capilar, é denominada Fluxo eletro-osmótico (FEO) (SANTORO et al., 2000), como mostra a Figura 3.

FIGURA 3: Esquema mostrando a formação e o sentido do fluxo eletro-osmótico



FONTE: QUEIROZ; JARDIM, 2005.

Este fluxo depende da carga do capilar (ξ), da viscosidade (η) e da constante dielétrica do tampão (ϵ).

$$\mu_{\text{FEO}} = \epsilon \xi / \eta$$

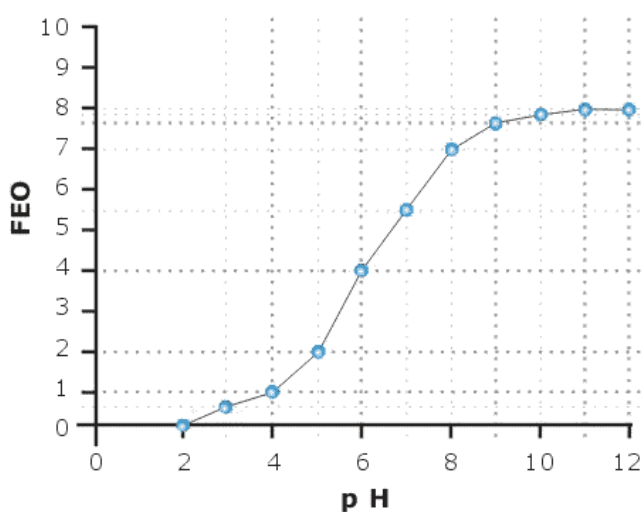
Então a FEO depende diretamente do pH do eletrólito, pois a carga do capilar (ξ) é governada pela ionização dos grupos silanois; que é pH dependente (ALTRIA, 1996). Com incremento de pH de três para oito, o fluxo eletro-osmótico (μ_{FEO}) pode

ser aumentado até 10 vezes (WATSON, 1999), em valores de pH menores que dois não há fluxo eletro-osmótico, pois a maior parte dos grupos silanois está protonado (BAKER, 1995), como mostra a Figura 4.

A alta concentração de anions no tampão quando a temperatura é controlada leva a um decréscimo da FEO (BAKER, 1995), pois reduzem a interação das moléculas de água com as paredes do capilar (WATSON, 1999).

A adição de modificadores como solventes orgânicos têm efeito variável, pois afetará a viscosidade, constante dielétrica e potencial Z, a influência deste dependerá também da concentração adicionada; por exemplo, adicionar metanol à água aumenta a viscosidade da solução até a concentração de 50% (v/v), a partir de então decresce até 100% de metanol (BAKER, 1995).

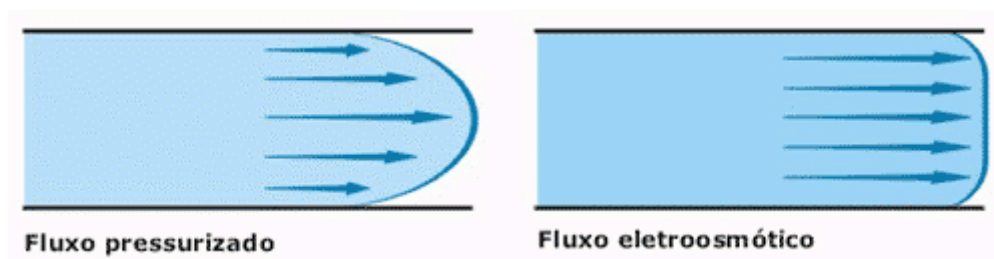
FIGURA 4: Gráfico mostrando a variação do fluxo eletro-osmótico em função do pH.



FONTE: QUEIROZ; JARDIM, 2005.

O perfil do fluxo eletro-osmótico é do tipo plano (plug), o que implica dizer que as moléculas se movimentaram em velocidades muito próximas (Figura 5), isto significa uma vantagem frente à CLAE e seu fluxo laminar (ANDRADE; CUSTODIO, 2005), pois permite uma maior eficiência na separação dos picos, sendo os perfis destes mais estreitos (WATSON, 1999).

FIGURA 5: Esquema ilustrando as diferenças entre o perfil do fluxo pressurizado e o eletro-osmótico.



FONTE: QUEIROZ; JARDIM, 2005.

Existem cinco formas de operação de EC: Eletroforese capilar de zona (CZE) também chamada de EC em solução livre, eletroforese capilar em gel (CGE), eletrocromatografia capilar micelar (MEKC), eletroforese capilar com focalização isoelétrica (CIEF) e isotacoforese capilar (CITP) (United States Pharmacopeia, 2002).

2.4.2 Eletroforese capilar em solução livre

O mecanismo de separação está baseado nas diferenças apresentadas pela razão carga/raio iônico, das espécies analisadas (SANTORO et al., 2000). A combinação entre a mobilidade eletroforética e a magnitude do fluxo eletro-osmótico, leva a separação das espécies eletricamente carregadas (United States Pharmacopeia, 2002), permitindo a separação de cátions e ânions na mesma corrida, mas não de espécies neutras (ANDRADE; CUSTODIO, 2005). Pode ser utilizada para solutos solúveis e insolúveis em água (BAKER, 1995). A separação é regida pela mobilidade eletroforética e pelo fluxo eletro-osmótico (FEO).

Os parâmetros de separação avaliados para EC são: tempo de migração, eficiência e resolução. Cada um destes é influenciado por um ou mais dos parâmetros eletroforéticos, incluindo diferença de potencial aplicada, mobilidade eletroforética, FEO e comprimento do capilar.

O tempo de migração (t_m): O tempo de migração de um soluto é o tempo que este leva para migrar pelo comprimento efetivo do capilar (L) desde a entrada até sua chegada no detector.

Pode ser expresso como:

$$t_m = L / (\mu_{EP} + \mu_{FEO})V$$

Onde L: comprimento do capilar; μ_{EP} : mobilidade do soluto; μ_{FEO} : fluxo eletro-osmótico e V: ddp.

Assim altas ddp, capilares curtos e altos FEO levam a tempos de migração mais curtos e conseqüentemente, análises mais rápidas.

A eficiência (N): expressa o número de pratos teóricos e pode ser calculada utilizando o tempo de migração e área, segundo a fórmula:

$$N = 16(t_m/w)^2$$

Onde t_m : tempo de migração e w: largura do pico na altura da linha de base.

Sendo assim quanto maior o tempo de migração maior será o número de pratos teóricos (BAKER, 1995).

A resolução (R): Indica o quanto estão separados dois picos consecutivos da mesma amostra e é calculada pela fórmula:

$$R = 2(t_2 - t_1) / (w_1 + w_2)$$

Na qual t_1 e t_2 representam os tempos de eluição de picos consecutivos e w_1 e w_2 indicam a largura do pico na altura da base, sendo o parâmetro mais importante de separação (BAKER, 1995).

2.5 VALIDAÇÃO

Todo método analítico, para merecer o nome, deve ser cientificamente respaldado e quando utilizado por diferentes operadores, com equipamento similar, em diferentes laboratórios deve ser capaz, dentro de certos limites, de fornecer resultados confiáveis. Em outras palavras, deve ter uma base racional e ser adequado para o propósito estabelecido. O processo que demonstra que tal método funciona é chamado de validação analítica ou validação de método analítico (SHARP, 2000).

Segundo a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003). Para a USP (United States Pharmacopeia) o processo de validação deve fornecer evidências documentadas de que o método está apto para realizar aquilo para o qual é indicado (United States Pharmacopeia, 2002).

Em recente estudo sobre validação de métodos eletroforéticos aplicados à análise de compostos farmacêuticos, foi empreendido um esforço entre a Comunidade Européia, Japão e Estados Unidos visando harmonizar os procedimentos de validação nessa área, surgiu assim a ICH, Conferência Internacional de Harmonização (LANÇAS, 2004).

TABELA 1 – Elementos requeridos para validação de ensaios.

Características de desempenho analítico	Identificação	Teste de impurezas		Quantitativo
		quantitativa	Teste limite	
Exatidão	-	+	-	+
Precisão	-	+	-	+
Repetibilidade	-	+	-	+
Precisão intermediária	-	+	-	+
Especificidade	+	+	+	+
Limite de detecção	-	-	+	-
Limite de quantificação	-	+	-	-
Linearidade	-	+	-	+
Faixa de trabalho	-	+	-	+

-: normalmente não avaliado; +: normalmente avaliado.

FONTE: ICH, 2005.

A ICH define quatro tipos de ensaios analíticos (ensaio de identificação, quantificação de impurezas, teste limite de impurezas e teste quantitativo de princípio ativo) e sugere os parâmetros a serem validados (Tabela 1) para cada um destes.

2.5.1 Especificidade ou Seletividade

É a capacidade que um método possui de medir inequivocamente um composto em presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação ou componentes da matriz (ANVISA, 2003), por tanto é uma medida do quanto o método é indiferente à presença, na amostra, de espécies que poderiam interferir na determinação do analito (LEITE, 2002).

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental (RIBANI et al., 2004).

Na literatura é comum encontrar os termos especificidade e seletividade como sinônimas, mas existem órgãos regulatórios que fazem claras distinções entre ambos os conceitos. Assim a Western European Laboratory Accreditation Cooperation (WELAC) define a seletividade como sendo a referência à extensão na qual o método é capaz de determinar um certo analito em particular presente em uma mistura complexa sem interferentes dos componentes da mesma, já especificidade é definida como sendo a perfeição da seletividade para um analito ou grupo de analitos; O ICH não faz distinção entre ambas as definições, mas utiliza apenas o termo especificidade (VESSMAN, 1996). As definições da International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), não deixa lugar a dúvidas é coloca a especificidade como sendo o máximo da seletividade supondo então que nenhuma interferência possa ocorrer enquanto que seletividade determina a extensão em que outras substâncias presentes na matriz interferem na determinação do analito em questão (IUPAC, 2007).

Neste trabalho será utilizado o termo seletividade, por ser, segundo a definição da IUPAC, o mais apropriado para definir a interferência da matriz na determinação do analito de interesse.

2.5.2 Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (ANVISA, 2003); está relacionada diretamente com o sistema de emissão analítica (LEITE, 2002).

Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico (sinal *versus* concentração), os resultados deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados, para determinação do coeficiente de correlação (R^2), intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão e desvio padrão relativo. Se não houver relação linear, deve ser realizada a transformação matemática. Valor igual a 0,99 é o mínimo aceitável para o coeficiente de correlação (R^2) (ANVISA, 2003).

O ICH recomenda que para estabelecer a linearidade, um mínimo de cinco concentrações deve ser utilizado, realizando leituras em triplicata (ICH, 2005).

2.5.3 Intervalo

O intervalo de aplicação de um método corresponde ao intervalo no qual o procedimento se revelou satisfatório do ponto de vista de exatidão, precisão e linearidade (LANÇAS, 2004), normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método (BRASIL, 2003).

Para testes de quantificação a USP 25 recomenda que seja avaliado entre 80 e 120% da concentração de teste (United States Pharmacopeia, 2002).

2.5.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo, em relação ao valor verdadeiro (ANVISA, 2003), várias metodologias para determinação da exatidão estão disponíveis dependendo de sua aplicação (ICH, 2005).

Para matéria prima: Aplicando a metodologia proposta na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência) ou pela comparação dos resultados obtidos, com aqueles resultantes de uma metodologia bem caracterizada, cuja exatidão tenha sido estabelecida.

Para produto acabado: Pela análise de uma amostra, na qual quantidade conhecida de fármaco foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado) ou no caso em que amostras de todos os componentes do medicamento estão indisponíveis, se aceita a análise pelo método de adição de padrão, no qual se adiciona quantidades conhecidas do analito (padrão de referência) ao medicamento.

É calculada como porcentagem de recuperação da quantidade do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração média nominal}} \times 100$$

2.5.5 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra, é comumente expressa como desvio padrão ou desvio padrão relativo e é considerada em três níveis (BRASIL, 2003; United States Pharmacopeia, 2002).

2.5.5.1 Repetibilidade

Também chamada de precisão intra-dia ou intra-análise. Representa a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista e mesma instrumentação (BRASIL, 2003), em outras palavras é a maior diferença no nível de 95% de confiança entre dois resultados obtidos nas mesmas condições (CIENFUEGOS, 2005).

Os documentos da ICH recomendam um mínimo de nove determinações, cobrindo todo o intervalo (triplicata de três concentrações diferentes) ou seis determinações a 100% da concentração de trabalho (ICH, 2005).

2.5.5.2 Precisão intermediária ou inter-análise

É a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou instrumentos diferentes (ANVISA, 2003). Os documentos da ICH recomendam que as variáveis a ser estudadas sejam avaliadas conforme as circunstâncias em que o método será utilizado; as variáveis mais comuns incluem dias, analista, equipamento; não sendo necessária a avaliação destas variáveis de forma independente (ICH, 2005).

A ANVISA recomenda um mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes (BRASIL, 2003)

2.5.5.3 Reprodutibilidade ou precisão inter laboratorial

Representa a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica (ANVISA, 2003)

2.5.6 Robustez

É uma medida da capacidade de um método de não sofrer alteração em decorrência de pequenas variações, deliberadamente introduzidas nos parâmetros do método (LANÇAS, 2004); é um indicativo de sua confiança durante o uso na rotina (ANVISA, 2003).

Em trabalhos onde há mudança de fornecedores, marcas ou equipamentos ao longo do desenvolvimento e validação dos métodos, sem alteração significativa nos resultados, pode se dizer, que o método possui robustez intrínseca, pois manteve sua resposta em meio a mudanças no ambiente de análise (RIBANI et al., 2004).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Desenvolver e validar um método analítico por eletroforese capilar, para identificação e quantificação dos tuberculostáticos rifampicina, pirazinamida e isoniazida, em associação ou isoladamente, quando presentes na forma farmacêutica sólida do tipo comprimido.

3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Estabelecer parâmetros e condições de análise por eletroforese capilar para os fármacos isoniazida, pirazinamida e rifampicina.

Validar o método analítico quanto aos parâmetros de precisão, exatidão especificidade, linearidade, intervalo e robustez.

Comparar o método desenvolvido e validado para eletroforese capilar com outro método proposto, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência, verificando operacionalidade e custo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Equipamentos

Balança analítica (0,01 mg) METTLER TOLEDO modelo AG 245.

Agitador magnético com aquecimento FISATON

Purificador de água por osmose reversa marca TKA LAB-UPW

Centrífuga Minispin plus (EPPENDORFE).

Potenciômetro HI 8519 N (HANNA).

Aparelho de Ultra som - UltraCleaner 800 A (UNIQUE)

Cromatógrafo líquido de alta eficiência SHIMADZU LC-10AT com detector de arranjo de foto diodos (DAD) ultravioleta visível

Aparelho de Eletroforese Capilar AGILENT CE, com detector de arranjo de fotodiodos

Espectrofotômetro UV-Vis SHIMADZU 1650 PC

Micropipetas GILSON e MATLAB.

4.1.2 Vidraria

Aparelhos volumétricos (pipetas e balões) classe A.

Viais descartáveis em polipropileno de 2mL AGILENT HP.

Tampa tipo *snap* septada em polipropileno AGILENT HP.

Sistema de filtração para solvente.

4.1.3 Consumíveis

Ponteiras; seringa e microtubos de centrifugação.

Membrana filtrante de celulose regenerada, 25 mm de diâmetro e porosidade 0,45µm para fase móvel e para amostra membrana PTFE modificada 0,45 µm e 13 mm de diâmetro; ambas não estéreis (MILLIPORE).

Coluna C18, MICROSORB-MV 100 (150 x 4,6 mm-5µm) (VARIAN).

Capilares de sílica fundida de 50µm de diâmetro interno (64,5 cm - 56 cm efetivos) revestidos com poliimida AGILENT HP

4.1.4 Reagentes

Todos os reagentes utilizados atendiam a especificação grau analítico (PA): Fosfato monobásico de sódio; borato de sódio; hidróxido de sódio, fosfato dibásico de potássio e lauril sulfato de sódio (SDS), estearato de magnésio, celulose microcristalina e lactose.

Os solventes utilizados: metanol, acetonitrila, tetrahidrofurano e dimetil sulfoxido atendiam a especificação grau cromatográfico.

Os fármacos grau farmacêutico utilizados foram rifampicina 98,9%, isoniazida 99,6% e pirazinamida 98,7%, dentro do prazo de validade (julho de 2007) fornecidos por Far-Manguinhos e os fármacos padrão de referência USP foram rifampicina 99,50%, isoniazida 100% e pirazinamida 99,7%.

Formas farmacêuticas: comprimidos de Isoniazida 100 mg, de Pirazinamida 500 mg, e associação de Isoniazida 100 mg e Rifampicina 150 mg. Cápsulas de gelatina dura de Rifampicina 300 mg; todos gentilmente cedidos pelo Hospital de Clínicas da UFPR.

A água utilizada para as análises foi água ultra-pura.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Soluções

4.2.1.1 Eletrólito de fundo

Foram testados como eletrólitos de fundo, soluções de ácido N-2, hidroxiethylpiperazina-N-etanosulfônico (HEPES), fosfato e borato.

Para o eletrólito HEPES pH 7,0 a concentração utilizada foi de 30 mmol/L, em quanto que para os eletrólitos borato e fosfatos foram preparadas soluções estoque de concentração 100 mmol/L, mantida sob refrigeração até o momento de uso. O preparo destas era semanal e a partir delas, nova solução de trabalho, na concentração testada, foi preparada a cada dia.

Tampão Borato 100 mmol/L: Foram pesados 3,8132 g de tetraborato de sódio heptahidratado e dissolvidos em aproximadamente 60 mL de água ultra-pura mediante agitação e aquecimento moderado por aproximadamente 10 min; após o aquecimento e já à temperatura ambiente a solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com água ultra-pura.

Tampão fosfato 100 mmol / L: foram pesados 1,4196 g de fosfato dibásico de sódio e dissolvidos em aproximadamente 70 mL de água ultra-pura, este volume foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL e o volume ajustado com água ultra-pura.

Tampão 40 mmol / L (tampão fosfato e borato): Em balão volumétrico de 25 mL, foram pipetados 10 mL da solução 100 mmol/L e o volume final completado com água ultra-pura. Os ajustes necessários de pH das soluções de tampão fosfato e borato assim preparadas, foram realizados utilizando NaOH 0,1 N ou HCl 0,1 N.

Após o ajuste do pH o tampão foi filtrado utilizando membrana de PTFE de porosidade 0,45 μm .

4.2.1.2 Soluções dos fármacos

As soluções dos fármacos (isoniazida, pirazinamida e rifampicina) foram preparadas para uma concentração final de 1 mg/mL, as quais foram chamadas soluções estoque. Estas foram preparadas diariamente e mantidas em refrigerador até o momento de uso. As soluções de trabalho foram preparadas a partir destas soluções à temperatura ambiente.

Solução estoque de isoniazida e pirazinamida: Foram pesados 0,025 g de cada fármaco e transferidos a um balão volumétrico de 25 mL e dissolvidos em aproximadamente 15 mL de água ultrapura, após confirmação da completa dissolução sob fundo preto, foram levados a volume final com água ultrapura.

Solução estoque de Rifampicina: Foram pesados 0,050 g do fármaco e transferidos a um balão volumétrico de 50 mL e dissolvidos em 25 mL de metanol, o volume final foi completado com água ultrapura.

4.2.2 Desenvolvimento analítico

A primeira etapa do trabalho foi o desenvolvimento do método analítico por eletroforese capilar para identificação e quantificação dos fármacos em estudo nas formas de matéria prima (grau farmacêutico) e produto acabado.

4.2.2.1 Definição dos parâmetros eletroforéticos

Para definição dos parâmetros foram realizados estudos do comportamento eletroforético dos três fármacos em associação equimolecular.

Os parâmetros avaliados durante os ensaios foram: diferença de potencial, temperatura e tempo de corrida; pH, natureza e concentração do eletrólito de fundo; tempo de injeção, concentração dos fármacos e determinação do comprimento de onda mais adequado. Para este último foi necessária a obtenção dos espectros de absorção no UV-Vis. As soluções dos fármacos utilizadas para obtenção destes espectros, foram preparadas utilizando eletrólito de fundo como solvente (tampão fosfato 40 mmol/L, pH 9,0).

A partir dos espectros foram definidos os comprimentos de onda mais adequados para análise de cada fármaco.

Os cálculos de volume total do capilar e de volume de injeção foram realizados utilizando o programa CE Expert Lite disponível no sitio da Beckman coulter, (<http://www.beckmancoulter.com/resourcecenter/labresources/ce/ceexpert.asp>)

O parâmetro de eficiência (N) foi calculado para as condições ótimas; utilizando a fórmula correspondente (pág 20).

Para explicar a migração eletroforética foi realizado o estudo por modelagem molecular, da estrutura dos fármacos isoniazida e pirazinamida. As estruturas foram desenhadas utilizando o programa ISISDraw 2.4. Estes desenhos foram então

transferidos para o programa HyperChem 7.1 (HyperCube, Inc.) para realização dos cálculos de modelagem molecular.

Inicialmente, utilizou-se a Mecânica Molecular (campo de força MM+) para construção dos modelos 3D e otimização inicial de suas energias conformacionais. A partir destes modelos otimizados, utilizou-se um método Quanto-Mecânico (semi-empírico AM1) para geração das cargas parciais dos átomos constituintes das moléculas estudadas.

Os parâmetros utilizados foram para a mecânica molecular: campo de força: MM+ e para o método quanto mecânico (semi-empírico) método AM1. Para ambos foi utilizado algoritmo Polak-Ribiere (gradiente conjugado) e as condições de terminação foram em gradiente RMS de 0,01 kcal/mol em vácuo.

4.2.3 Validação

A validação foi realizada seguindo os parâmetros propostos pela Farmacopéia americana (United States Pharmacopeia, 2005), pela resolução RDC 899, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003) e os documentos da Conferência Internacional de Harmonização (ICH, 2005), foram utilizados também como orientação mais específica para eletroforese capilar os livros de Altria (1996) e Baker (1995).

Para os ensaios de linearidade e exatidão foram utilizados os fármacos padrão de referência USP. Para os demais ensaios utilizaram-se fármacos de pureza grau farmacêutico.

4.2.3.1 Especificidade

Para demonstrar a habilidade do método em determinar os fármacos na presença de excipientes comumente presentes nestas formas farmacêuticas, foi realizada a comparação dos eletroferogramas obtidos dos fármacos contaminados com quantidade apropriada de placebo (mistura de estearato de magnésio, celulose microcristalina e lactose 1:1:1), segundo recomendação da ANVISA.

4.2.3.2 Linearidade

Para avaliação desta foi construído um gráfico de resposta analítica para cada fármaco na faixa de concentração entre 5 - 120 µg/mL.

Para cada fármaco foram preparadas três soluções mãe de mesma concentração, a partir das quais foram preparadas as soluções de corrida, de tal forma que foram realizadas três leituras, em triplicata, para cada ponto.

Com os dados obtidos foram traçados os gráficos de linearidade, considerando área corrigida (área / tempo de eluição) *versus* concentração.

A partir destes dados foi escolhida a melhor concentração de trabalho dentro da faixa de linearidade, considerando uma região de $\pm 20\%$ para avaliação do intervalo.

O esquema das diluições utilizadas está representado na tabela 2.

TABELA 2 – Preparo de soluções teste a partir de soluções mãe (1 mg/mL) dos fármacos: isoniazida, pirazinamida e rifampicina, para avaliação da linearidade.

Concentração desejada (µg/mL)	FÁRMACOS	Volume final (mL)
5	0,5	100
10	1,0	100
20	2,0	100
40	4,0	100
60	6,0	100
80	8,0	100
100	2,5	25
120	1,2	10

Todas as soluções foram preparadas utilizando vidraria volumétrica e os volumes medidos com as pipetas ou micropipetas mais apropriadas.

4.2.3.3 Intervalo

Para a confecção do gráfico de intervalo foram preparadas novas soluções-mãe utilizando padrões de referência USP.

As soluções foram preparadas de modo semelhante às utilizadas para avaliação da linearidade; assim para cada fármaco foram preparadas três soluções mãe de mesma concentração, a partir das quais foram preparadas as soluções de corrida, em cinco concentrações diferentes; sendo realizadas três leituras, em triplicata, para cada ponto.

As concentrações das soluções de corrida pertencem ao intervalo entre 80 - 120% da concentração considerada ideal para solução teste, seguindo assim as especificações para teste de linearidade apresentadas pelos órgãos regulatórios nacionais e internacionais (BRASIL, 2003, United States Pharmacopeia, 2002 e ICH, 2005).

Foram traçados os gráficos de área corrigida versus concentração para cada fármaco; a equação da reta e o coeficiente de correlação (R^2) foram encontrados aplicando a regressão linear por mínimos quadrados utilizando o programa Microsoft Excel®.

TABELA 3 - Preparo de soluções teste a partir de soluções mãe (1 mg/mL) dos fármacos: isoniazida, pirazinamida e rifampicina, para avaliação do intervalo.

Concentração utilizada (µg/mL)	Sol mãe ISN (mL)	Sol mãe PYR (mL)	Sol mãe RIF (mL)	Volume final mL
45	4,5	4,5	-	100
55	5,5	5,5	-	100
60	6,0	6,0	-	100
65	6,5	6,5	-	100
75	7,5	7,5	-	100
60	-	-	6,0	100
70	-	-	7,0	100
80	-	-	8,0	100
90	-	-	9,0	100
100	-	-	10,0	100

4.2.3.4 Precisão

Os ensaios de precisão realizados foram o de repetibilidade e precisão intermediária tanto para os fármacos isolados como para a mistura equimolecular dos mesmos.

Segundo Dejaegher (2007) os parâmetros a serem avaliados são área corrigida e tempo de migração; utilizando como critério o valor de DPR; considerado aceito pela ANVISA (BRASIL, 2003) quando menor que 5% e segundo Leite (2002), quando menor que 2%.

4.2.3.4.1 Repetibilidade

Foram avaliadas soluções dos três fármacos de forma isolada, nas concentrações de 60 µg/mL para ISN e PYR e 90 µg/mL para RIF e da mistura destes três na concentração de 70 µg/mL para cada fármaco.

As leituras foram feitas em triplicata, obtendo-se um total de nove pontos para cada caso. A partir destes foi calculado o DPR para tempo, e área corrigida.

4.2.3.4.2 Precisão intermediária

Foi avaliada em dois dias consecutivos, sendo utilizados como valores do primeiro dia aqueles obtidos para repetibilidade; para obtenção dos valores do segundo dia foram preparadas novas soluções, de mesma concentração, a partir das mesmas soluções mãe.

Com os valores obtidos foi calculado o DPR para o tempo e para a área corrigida, utilizando a média obtida para estes parâmetros a cada dia.

4.2.3.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada por ensaio de recuperação em que quantidades conhecidas de cada fármaco foram adicionadas a uma matriz de placebo, (mistura 1:1:1 de estearato de magnésio, celulose microcristalina e lactose) e posteriormente analisadas.

Para cada fármaco foram efetuadas três pesagens com concentrações diferentes e as leituras foram realizadas em triplicata, como recomenda o *International Conference Harmonization* (ICH), obtendo-se um total de nove pontos.

As quantidades pesadas encontram-se na tabela 4 a seguir.

TABELA 4 – Quantidades dos fármacos adicionadas à matriz de placebo para avaliação da exatidão do método.

Isoniazida*			Pirazinamida*			Rifampicina**		
Peso (mg)	Vol. final (mL)	Cc nominal (µg/ mL)	Peso (mg)	Vol. Final (mL)	Cc nominal (µg/ mL)	Peso (mg)	Vol. Final (mL)	Cc nominal (µg/ mL)
5,71	100	57,1	51,9	100	51,9	2,27	50	45,4
3,22	50	64,4	2,98	50	59,6	3,63	50	72,6
3,64	50	72,8	3,48	50	69,6	4,32	50	86,4

Solvente utilizado: *água, ** água/metanol (50:50).

4.2.3.6 Robustez

Foram utilizadas soluções dos fármacos (ISN, PYR e RIF) nas mesmas concentrações do ensaio de repetibilidade, variando-se os parâmetros analíticos: pH e temperatura do suporte do capilar. O ajuste de pH do eletrólito de fundo foi alterado para $\pm 0,2$ unidades do pH ideal; e a temperatura do suporte foi programada para $\pm 2^{\circ}\text{C}$ em relação a temperatura considerada ideal.

As respostas obtidas foram avaliadas quanto à desvio padrão relativo (DPR) de tempo e de área corrigida, para avaliar a variabilidade da resolução foi aplicado o teste de Dixon a 5% de significância.

4.2.4 Adequação do sistema, teor de isoniazida e rifampicina em associação no comprimido.

Para a determinação do teor de fármaco (doseamento) no produto acabado, o número de unidades utilizadas foi o recomendado pela Farmacopéia Brasileira quarta edição (1988). Foram pesados vinte comprimidos da associação e calculado o peso médio, então foram triturados até obtenção de um pó homogêneo, o qual foi mantido em dessecador e ao abrigo da luz até o momento do uso.

Para avaliação do método desenvolvido foram pesados exatamente 315,2 mg do pó homogeneizado correspondente a 100 mg de isoniazida e 150 mg de rifampicina, e transferidos para um balão volumétrico de 100 mL, dissolvidos com 50 mL de metanol e então completado o volume com água ultrapura.

Um volume de 1,25 mL desta solução foram diluídos para 25 mL utilizando-se como solvente água ultrapura, de tal forma que a concentração final foi de 50 µg/mL de isoniazida e 75 µg/mL de rifampicina.

Como nos demais procedimentos procedeu-se a filtração antes da injeção.

As leituras foram feitas nos comprimentos de onda 269,5 nm (ISN e RIF), 263,5 nm (ISN) e 334,5 nm (RIF).

O cálculo da concentração do fármaco na forma farmacêutica (DFC) foi realizado com o valor da média dos valores obtidos, da seguinte forma:

$$DFC = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração nominal solução}} \times \text{concentração declarada}$$

Foi avaliada também a precisão neste ensaio de quantificação. As concentrações utilizadas foram: 50 µg/mL para ISN e 75 µg/mL para RIF. Os valores de DPR foram considerados como parâmetro de avaliação, segundo especificado pela ICH (2005). O critério de aceitação é o mesmo citado no item 4.2.3.4.

4.2.5 Comparação com o método por CLAE

O método desenvolvido para EC, após sua validação, foi comparado com o método proposto por CALLERI et al. (2002) apresentado a seguir.

4.2.5.1 Preparo de amostra

Foram pesados vinte comprimidos para cálculo do peso médio, os quais foram finamente triturados e homogeneizados.

Foi pesada com exatidão, uma quantidade do homogeneizado correspondente a 37,5 mg de isoniazida, 75 mg de rifampicina, dissolvidos em balão volumétrico de 50 mL com tampão fosfato (50 mmol/L) pH 3,5 e metanol, na proporção 50 : 50 (v/v). Esta amostra foi submetida a ultra-som (40 kHz) por 10 min a 40 °C e por mais 40 min a temperatura ambiente, então foi filtrada e um mililitro desta foi diluído até volume final de 10 mL (vidraria volumétrica) utilizando o mesmo solvente.

4.2.5.2 Preparo de soluções de referência

Dez mg de isoniazida foram dissolvidos e diluídos em água deionizada até um volume de 100 mL, obtendo uma concentração final de 1,5 mg/mL; 150 mg de rifampicina foram dissolvidos e diluídos em metanol até volume de 50 mL, obtendo uma concentração final de 3 mg/mL.

As soluções de referência foram mantidas a 4 °C, até o momento de uso, então um mL de cada solução foi transferida a um balão volumétrico de 20 mL e

levado a volume final com tampão fosfato (50 mmol/L) pH 3,5 / metanol 50:50 (v/v), até concentração de 75 µg/mL para isoniazida e 150 µg/mL para rifampicina

4.2.5.3 Condições cromatográficas

Foi utilizada coluna: Lichospher 100 RP18 (250 x 4 mm LD) (5 µm).

A fase móvel utilizada é composta de acetonitrila (A) e 50 mmol/L de tampão fosfato pH 3,5 (B). A eluição ocorreu em gradiente de concentração (A:B), sendo nos cinco minutos iniciais 3:97 v/v com aumento linear até atingir 50:50 v/v aos 30 min e retorno a concentração inicial em 10 min. A cromatografia foi conduzida à temperatura ambiente com fluxo de 1mL/min com tempo total de corrida de 40 min. Nestas condições os tempos de retenção são de 4,4 e 31,4 para isoniazida e rifampicina respectivamente. O comprimento de onda utilizado foi de 254 nm para rifampicina, 261 nm para isoniazida.

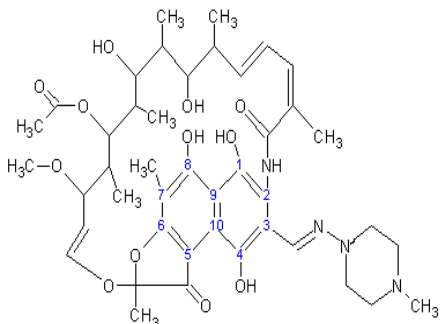
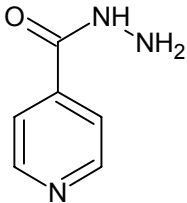
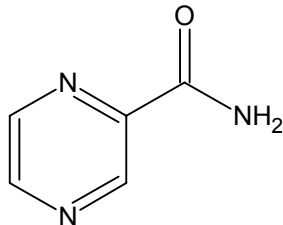
A comparação dos resultados encontrados por EC e CLAE foi realizada utilizando teste F, os cálculos foram realizados utilizando o programa Microsoft Excell®, a comparação entre os volumes de solventes utilizados em cada caso foi realizada por comparação do consumo teórico e seus custos foram calculados a partir dos custos desta pesquisa.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

Segundo a equação para cálculo da mobilidade eletroforética (item 2.4.1, pg 15) a diferença na mobilidade de diferentes solutos é definida pela relação carga/raio do íon, sendo diretamente proporcional a esta, ou seja, quanto maior a relação, maior será a mobilidade. Fica claro então que a mobilidade eletroforética da rifampicina será bem menor que a da isoniazida e da pirazinamida, considerando seu caráter ácido e seu tamanho.

TABELA 5 - Estruturas químicas, peso molecular, valores de pKa e considerações teóricas sobre a ionização em diferentes valores pH da rifampicina, isoniazida e pirazinamida.

	RIFAMPICINA	ISONIAZIDA	PIRAZINAMIDA
estruturas			
PM	822,95	137,14	123,11
pka	1,7 (4 hidroxí) e 7,9 (N da 3 piperazina).	2,0 e 3,5 (BH+)	0,5 (BH+)
pH 3	Ionizada -	Não ionizada	Não ionizada
pH 7	Ionizada -	Não ionizada	Não ionizada
pH 9	Ionizada -	Ionizada -	Não ionizada

A isoniazida e a pirazinamida, possuem valores próximos em um dos pka e peso molecular semelhante como pode se observar na tabela 5. Estes valores de pka referem-se às espécies protonadas (ácido conjugado). Ambos os fármacos

possuem grupo funcional amida o qual geralmente se comporta como ácido muito fraco, o tipo de substituinte ligado ao nitrogênio da função amida pode influenciar no grau de acidez dos hidrogênios ligados a este grupo. O desafio da otimização do método foi, portanto, encontrar um valor de pH em que estes dois fármacos apresentem migração eletroforética diferente, para obter uma resolução suficiente em um tempo razoável.

5.2 OTIMIZAÇÃO

Todos os parâmetros capazes de influenciar a separação eletroforética, devem ser otimizados durante o desenvolvimento do método, os principais e mais comumente considerados são: seleção do eletrólito de fundo (EF), determinação da diferença de potencial e corrente a serem aplicadas, escolha do capilar, temperatura de análise, comprimento de onda ideal, seleção de ciclos de rinsagem e de tempos de injeção.

5.2.1 Escolha do tipo de eletroforese

Dentro das modalidades de EC, as mais simples são eletroforese micelar capilar (MEKC) e eletroforese de solução livre (ECL), que são amplamente utilizadas para quantificação de fármacos, sendo que a utilização de ECL fica restrita a separação de compostos com carga enquanto MEKC é mais utilizada para separação de compostos neutros (BAKER, 1995) de caráter mais lipofílico.

De acordo com as características físico-químicas, os três fármacos a serem analisados podem ser separados em dois grupos: de um lado a isoniazida (ISN) e a pirazinamida (PYR) que apresentam algumas semelhanças e de outro lado a rifampicina (RIF). As diferenças mais marcantes entre estes dois grupos são o peso molecular, valores de pKa, solubilidade e grupos cromóforos. Avaliando as estruturas químicas dos três fármacos, é possível deduzir que estes sofrem ionização diferenciada em um determinado valor de pH, sugerindo a possibilidade de separação por ECL. Cabe então, realizar os ajustes necessários para obter uma

força eletroosmótica (FEO) capaz de separar em um tempo razoável a ISN da PYR, pois a RIF devido a seu maior tamanho terá uma migração diferenciada.

5.2.2 Seleção do capilar

As dimensões dos capilares mais utilizados atualmente variam entre 25 e 100 cm de comprimento e entre 25 a 100 μm de diâmetro interno. Quanto à composição, os materiais mais comuns são: os de vidro tipo Pyrex, os de teflon e os de sílica fundida, cada um com suas vantagens. Os capilares de vidro tipo Pyrex são resistentes e não requerem revestimento externo para dissipar o calor, mas não são opticamente transparentes para comprimentos de onda abaixo de 280 nm. Os capilares de teflon são opticamente transparentes e são mais flexíveis, mas possuem uma baixa taxa de dissipação do calor quando submetidos a altas diferenças de potencial (ddp). Os de sílica fundida, em geral mais utilizados, são opticamente transparentes, mas pouco resistentes e para aumentar sua resistência são comumente recobertos por uma fina camada de poliimida (BAKER, 1995).

Ao realizar a escolha do capilar deve se considerar o diâmetro interno do mesmo, pois quanto maior, mais calor será gerado e maior será a diferença de temperatura (e por tanto de FEO) entre o centro e as paredes do capilar e quanto maior o comprimento, maior será o tempo de análise.

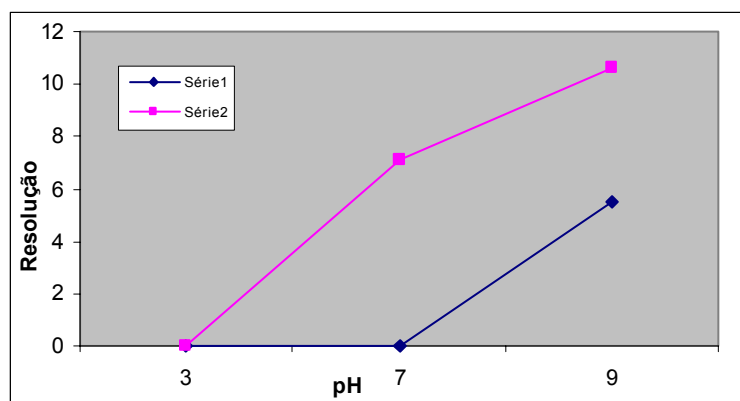
Como um dos propósitos do método é a praticidade, foi escolhido, por ser o material mais utilizado, um capilar de sílica fundida recoberto por poliimida, com comprimento total de 64,5 cm, tendo 56 cm efetivos e com diâmetro interno de 50 μm . Capilar este com especificações amplas o suficiente para ser utilizado por métodos eletroforéticos de rotina.

O volume de um capilar pode ser calculado em função de seu comprimento total (L) e diâmetro interno (d) pela relação: $V = (\pi L d^2 / 4)$, assim o volume do capilar escolhido foi de aproximadamente 1296 nL.

5.2.3 Seleção do Eletrólito de fundo (EF)

A composição, concentração e pH do eletrólito de fundo são importantes para ajuste dos parâmetros de retenção, seletividade e simetria dos picos em ECL (BAKER, 1995). A primeira avaliação realizada foi para definir o melhor pH para separação dos fármacos, pois este influencia significativamente o fluxo eletro-osmótico, alterando tempo de migração e seletividade. Teoricamente para a melhor resolução o pH ótimo é próximo ao pKa dos solutos em questão, pois as diferenças de ionização são máximas levando a migrações diferenciadas (BAKER, 1995). Inicialmente os testes foram conduzidos em três valores de pH: 3,0; 7,0 e 9,0, utilizando os tampões indicados como mais apropriados para cada pH (fosfato 25 mmol/L, HEPES 30 mmol/L e borato de sódio heptaidratado 40 mmol/L, respectivamente) (ALTRIA,1996).

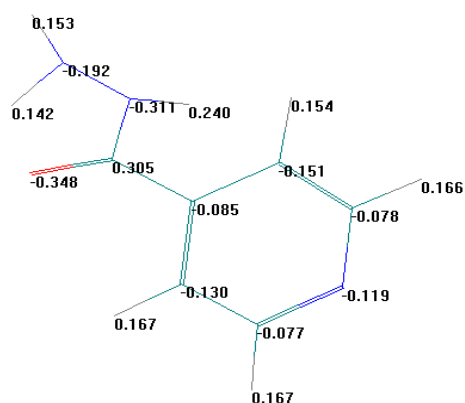
FIGURA 6 – Resolução para ISN e PYR (série 1) e ISN e RIF (série 2), encontrada para os valores de pH 3,0; 7,0 e 9,0.



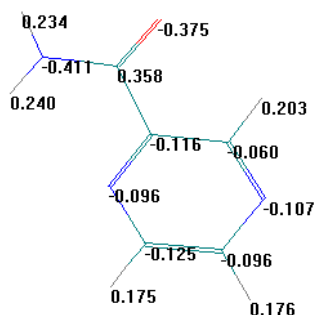
Os resultados de resolução encontrados para os valores de pH testado, encontram-se na figura 6. Esse resultado mostra que já em pH 7 é possível separar a rifampicina da mistura, pois neste pH este fármaco já se encontra ionizado (pKa 7,9). As corridas em pH baixo (3,0 e 7,0) não conseguiram resolver os fármacos ISN e PYR presentes na amostra, pois neste pH eles se encontram na forma neutra e por tanto não poderiam ser separados por EC livre, apenas com valor de pH igual a

9,0 foi possível à resolução destes dois fármacos. Esta resolução pode ter sido determinada pela ionização de um dos fármacos neste valor de pH podendo ainda ter sido facilitada por interação com o EF (borato) tornando possível à exploração da pequena diferença de caráter ácido e de tamanho existente entre ISN e PYR.

FIGURA 7 – Resultado do estudo por modelagem molecular (semi-empírico) da estrutura da ISN e PYR, mostrando as cargas parciais de cada átomo dentro do sistema.



ISONIAZIDA



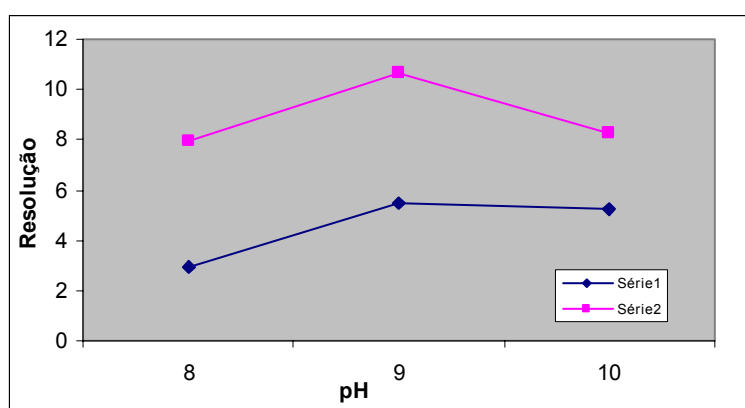
PIRAZINAMIDA

O caráter ácido da ISN é levemente mais acentuado que o da PYR, devido à diferença de grupos ligados ao átomo de nitrogênio do grupo amida. Na PYR dois átomos de hidrogênio estão ligados ao nitrogênio, enquanto que na ISN apenas um átomo de hidrogênio se liga ao nitrogênio deste grupo (amida), o que confere ao nitrogênio da isoniazida uma eletronegatividade menor que o correspondente na estrutura da pirazinamida; esta eletronegatividade menor pode justificar o caráter mais ácido do hidrogênio ligado ao grupamento amida da isoniazida (figura 7). O estudo realizado por modelagem molecular (semi-empírico) da estrutura destes compostos, permitiu determinar as cargas parciais de cada átomo dentro do sistema, reforçando com os valores encontrados a hipótese de a ISN possuir caráter levemente mais ácido que a PYR.

Acedo - Valenzuela (2002) encontraram que para ECL em pH básico menor que 12 a isoniazida e a pirazinamida migram juntas, com tudo neste trabalho foi obtida uma boa resolução para os três fármacos utilizando tampão borato a pH 9,0.

A partir deste resultado foram testadas alterações no pH da solução de borato 40 mmol/L; assim os valores de pH 8,0 e 10 também foram testados. A figura 8 ilustra estes resultados.

FIGURA 8 – Resolução para ISN e PYR (série 1) e ISN e RIF (série 2), encontrada para os valores de pH 8,0; 9,0 e 10.



Observando a figura 8 fica claro que a resolução obtida para PYR –ISN é a mesma a pH 9 e a pH 10, e portanto a escolha do pH fica por conta da maior

resolução entre ISN RIF, a qual é máxima quando a solução de eletrólito de fundo é ajustada a pH 9,0.

5.2.3.1 Composição do eletrólito de fundo.

A composição do tampão pode alterar o tempo de retenção e a seletividade, pois diferentes íons interagem de forma diferente com a parede do capilar e podem alterar o fluxo eletro-osmótico (BAKER, 1995). Para o pH selecionado, o eletrólito recomendado é o tampão borato preparado a partir de Na_4BO_7 . Como esta solução deve ser preparada após aquecimento e posterior resfriamento para ajuste de volume e pH, em função da sua praticidade, foi testado, o tampão fosfato preparado a partir do Na_2HPO_4 , o qual é muito mais solúvel em água a temperatura ambiente. Os resultados de tempo, área corrigida, desvio padrão relativo (DPR) e resolução encontram-se na tabela 6.

TABELA 6 – Valores de tempo, área corrigida e resolução para tampão fosfato e tampão borato.

	PIRAZINAMIDA			ISONIAZIDA			Rs	RIFAMPICINA			Rs
	TEMPO	A/T	DPR	TEMPO	A/T	DPR		TEMPO	A/T	DPR	
FOSFATO	2,8	22,35	1,73	2,9	8,24	1,11	5,222	3,2	8,00	0,90	10,563
	2,7	22,69		2,9	8,34		5,137	3,2	7,94		10,791
	2,7	21,70		3,0	8,30		5,155	3,3	7,97		10,221
	2,8	21,89		3,0	8,33		5,314	3,3	7,85		10,772
	2,8	22,54		2,9	8,52		5,159	3,2	7,88		10,381
	2,7	22,42		2,9	8,34		5,195	3,2	8,03		10,545
	2,6	21,32		3,1	8,19		5,240	3,4	7,79		10,526
BORATO	2,6	22,30	1,75	3,0	8,20	1,29	5,305	3,3	8,09	1,54	10,601
	2,7	22,15		3,0	8,43		5,055	3,3	7,91		10,363
	2,7	21,54		3,1	8,32		5,195	3,4	7,91		10,753
	2,6	21,71		3,1	8,35		5,181	3,4	7,97		10,327
	2,6	22,07		3,0	8,43		5,150	3,3	8,12		10,292

A tabela 6 mostra que os DPR para área corrigida permanecem menor que 2%, ou seja, dentro do considerado ideal para EC, independente da natureza do EF utilizado. Os tempos de migração também não sofreram variações significativas,

indicando que a resolução dos picos não ocorre por interação com o EF e sim por diferença na mobilidade eletroforética dos mesmos sob as condições estabelecidas para o método.

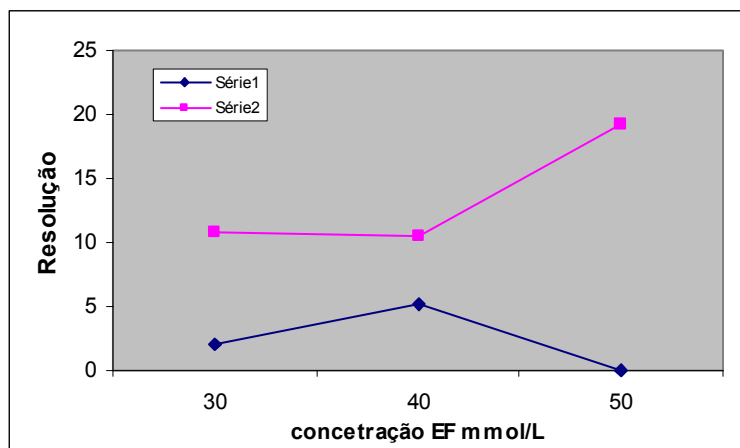
Para verificar se os dados obtidos para resolução pertencem à mesma distribuição normal, foi aplicado o teste de Dixon; Os valores de Q_{10} encontrados são (0,4 e 0,034 para resolução entre PYR e ISN e ISN e RIF respectivamente) menores ao valor de Q tabelado (0,479) e por tanto pode se concluir que a utilização de tampão borato ou tampão fosfato é indiferente para a resolução dos fármacos presentes na amostra; sendo assim o tampão fosfato pode substituir o borato em função da facilidade operacional do método.

5.2.3.2 Concentração do eletrólito de fundo

Considerando que a concentração do eletrólito de fundo pode alterar a simetria do pico, a presença de altas concentrações relativas de íons de soluto com relação à íons de solvente pode alterar a carga elétrica no capilar, provocando distorção dos picos. Para a melhor resolução e simetria, a concentração do eletrólito de fundo deve ser aproximadamente 100 vezes maior do que a concentração de soluto injetada (BAKER, 1995). Então concentrações de Na_2HPO_4 variando de 30 a 50 mmol/L foram testadas, mantendo a amperagem no limite máximo pretendido de 50 μA , para garantir uma boa reprodutibilidade. A figura 9 mostra a representação gráfica dos resultados obtidos deste teste na resolução entre PYR-ISN (série 1) e ISN-RIF (série2).

Na concentração de 50 mmol/L houve um aumento na resolução da Rifampicina, mas perda de resolução entre ISN e PYR, pois concentrações maiores levam a uma FEO menor e conseqüentemente a um aumento no tempo de migração levando a picos com base mais larga, o que compromete a resolução; os melhores resultados para tempo de migração mantendo a resolução foram obtidos utilizando a concentração de 40 mmol/L.

FIGURA 9 – Representação gráfica dos resultados obtidos para os testes de influência da concentração do eletrólito de fundo (fosfato pH 9,0) na resolução entre PYR-ISON (série 1) e ISON-RIF (série2).



5.2.3.3 Influência de solventes orgânicos

A adição de solventes orgânicos altera o fluxo eletro-osmótico (FEO) por alterar a viscosidade do eletrólito de fundo (EF); pela equação do cálculo do FEO (pg. 17) sabemos que este é inversamente proporcional à viscosidade do EF; assim solventes orgânicos capazes de alterar a viscosidade do eletrólito de fundo, promoveram alteração no FEO. Foram testadas as influências de metanol, dimetil sulfóxido (DMSO), tetrahidrofurano (THF) e dioxano, em diferentes concentrações.

A escolha destes solventes orgânicos também foi visando aumentar a solubilidade da rifampicina no EF, já que esta é pouco solúvel em água e muito solúvel nos solventes escolhidos.

THF, DMSO e dioxano, foram descartados, pois apresentaram um sinal negativo com o mesmo tempo de retenção que a pirazinamida. A concentração recomendada para solventes orgânicos varia de 1 - 30% (v/v), então o metanol foi testado em concentrações variando de 10 a 40%, concentrações menores não foram testadas, pois não aumentaram a solubilização da rifampicina no EF. Os resultados mostraram perda da resolução entre PYR e RIF a qual pode ser explicada pelo

aumento da viscosidade e conseqüente decréscimo da FEO (BAKER, 1995), que compromete a resolução (ALTRIA, 1996) e aumentam o ruído da linha de base e os tempos de migração.

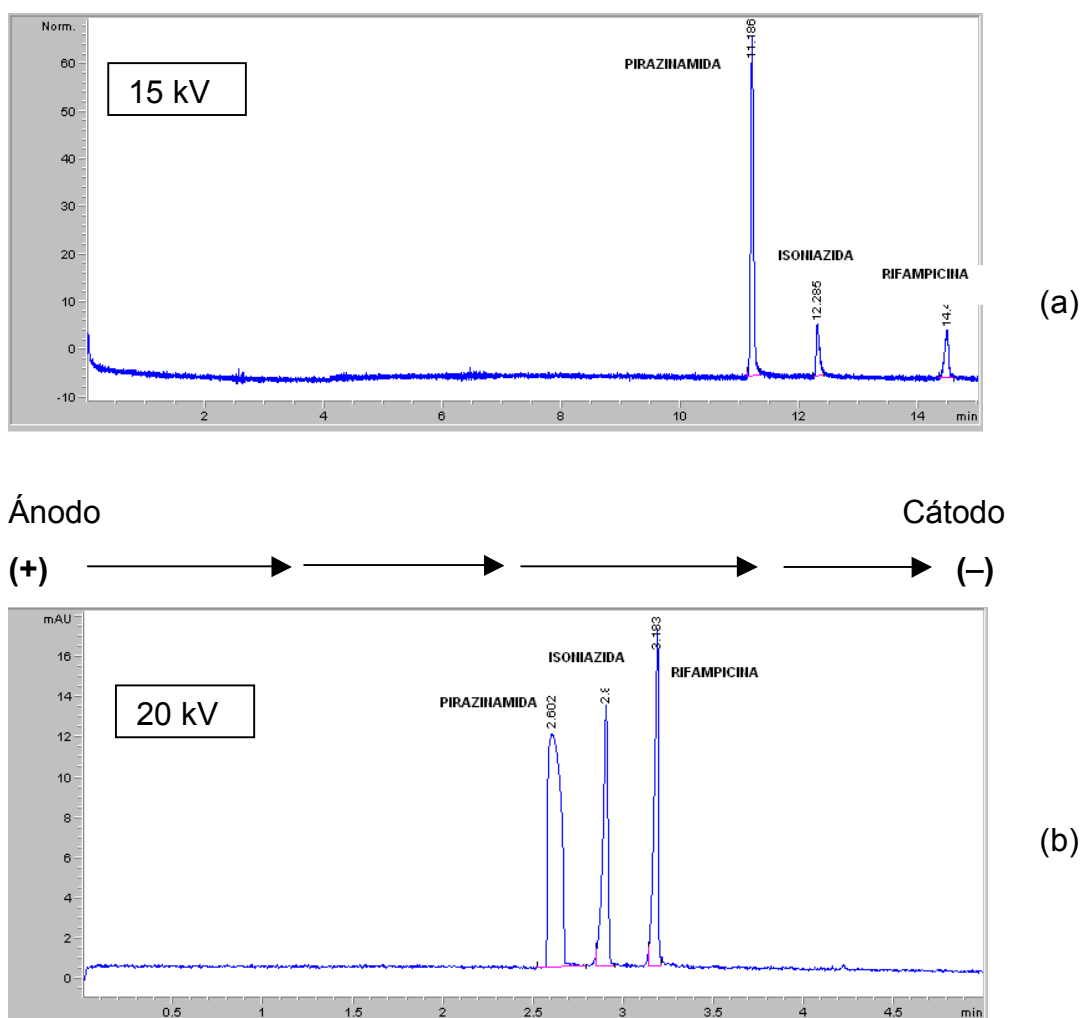
Assim os solventes orgânicos testados não trouxeram benefício nenhum e foram descartados.

5.2.4 Determinação da diferença de potencial

Para determinação da diferença de potencial (ddp) ideal foram testados valores de 15 a 30 kV. Como a ddp aumenta com o aumento da concentração do EF (ALTRIA, 1996), a escolha desta foi realizada junto à escolha da concentração do EF (BAKER, 1995).

A ddp foi ajustada para manter os valores de amperagem em um máximo de 50 μ A, para obter maior reprodutibilidade, como recomendado por Altria (1996). Sob estas condições, os melhores resultados foram obtidos quando as corridas foram conduzidas utilizando 20 kV. Como esperado as ddp mais baixas apresentaram menores tempos de migração e as mais altas acarretaram uma significativa perda na resolução (ALTRIA, 1996). Observando a figura 10 é possível perceber a significativa redução no tempo de análise ao aumentar a ddp aplicada.

FIGURA 10 - Eletroferograma (a) das concentrações recomendadas pela OMS obtido após corrida eletroforética com fosfato 30 mmol/L a 15 kV; (b) da mistura equimolecular obtido nas condições ideais (Fosfato 40 mmol/L 20 kV).



5.2.5 Pré- tratamento da amostra

Este parâmetro também deve ser otimizado, pois altas concentrações do analito podem levar à distorção dos picos e partículas presentes na amostra podem entupir o capilar. O tempo de injeção deve ser ajustado conjuntamente ao ajuste da concentração de trabalho, pois deste depende a quantidade de amostra injetada (ALTRIA, 1996).

Como a amostra é sólida ela deve ser previamente dissolvida, como recomendado por Baker (1995). A dissolução foi realizada em água, para favorecer o “stacking” que favorece a resolução e aumenta a eficiência dos picos.

A Isoniazida e a Pirazinamida foram facilmente dissolvidas em água ultra pura utilizando agitação por três minutos, as soluções foram filtradas e mantidas sob refrigeração até o momento de uso.

Já a Rifampicina é pouco solúvel em água e muito solúvel em metanol (MERCK, 2002). Então para favorecer a completa dissolução com o mínimo volume de solvente orgânico possível, as soluções mãe deste fármaco foram preparadas apenas em metanol. Após agitação por três minutos a solução foi filtrada e mantida sob refrigeração em frasco âmbar. As subseqüentes diluições foram realizadas em água, ficando pois minimizada a influência do metanol.

Tendo em vista que de acordo com o protocolo brasileiro para tratamento da tuberculose os fármacos são administrados em associação. Um dos medicamentos disponíveis é a forma farmacêutica comprimido, que contém ISN e RIF em associação.

Para minimizar a quantidade de solvente orgânico utilizado na dissolução do comprimido e não utilizar temperatura ou banho de ultra-som, tendo em vista que esta associação apresenta problemas de instabilidade que poderia ser agravada nestas condições, por esses motivos foi escolhida uma mistura de metanol / água 50% (v/v) como solvente. O comprimido foi dissolvido primeiramente utilizando a quantidade de metanol correspondente ao volume total de metanol na mistura, com agitação por dois minutos para garantir a completa dissolução da rifampicina e então o volume foi completado com água purificada até atingir a concentração final 50% metanol/água, com nova agitação por mais dois minutos. Uma vez completa a dissolução a solução foi filtrada e mantida sob refrigeração em frasco âmbar.

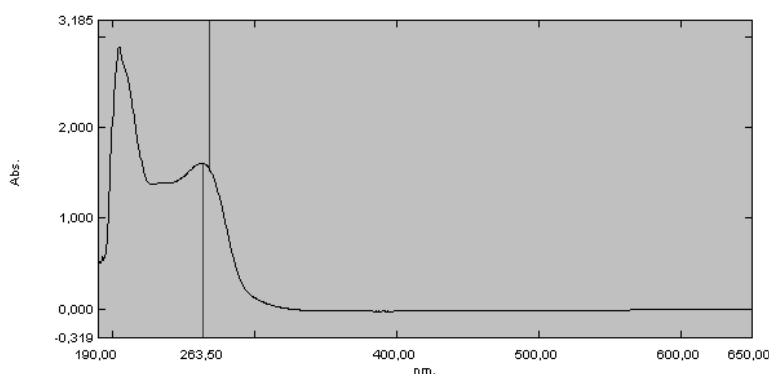
Para o desenvolvimento e otimização do método, foram utilizadas soluções de concentração de trabalho de 1000 µg/mL, para cada fármaco. Uma vez definidos os outros parâmetros foi estudado o intervalo do método e sua linearidade. Esta etapa foi realizada na fase de validação.

5.2.6 Comprimento de onda

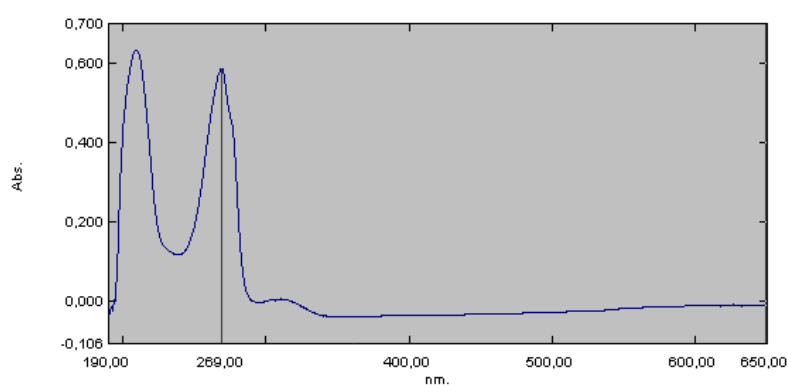
Em EC a detecção baseada na absorção de UV-Vis é amplamente utilizada e possui um limite de detecção de aproximadamente 10^{-13} - 10^{-16} mols (BAKER, 1995). Este baixo limite de detecção se deve ao pequeno caminho ótico, correspondente ao diâmetro interno do capilar, tipicamente 50 μ m.

O comprimento de onda ideal para leitura não é necessariamente aquele no qual o composto apresenta absorção máxima e sim aquele no qual o composto absorve livre de interferentes; assim o comprimento de onda ideal para solução de cada fármaco no EF, foi escolhido após realizar varredura no UV-Vis. Os espectros obtidos para cada fármaco, em concentração equimolecular e a superposição dos três encontram-se na figura 11.

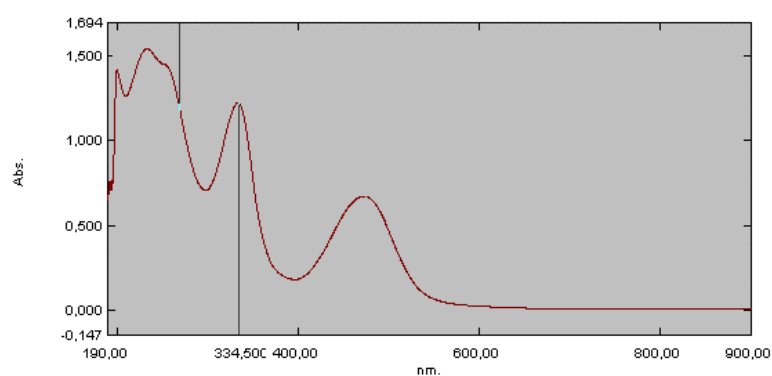
FIGURA 11 – Espectros de varredura no UV-Vis em tampão fosfato 40 mmol/L pH 9,0 para ISN indicando 263,5 e 269,5 (a); PYR indicando 269,0 nm (b); para RIF indicando 334,5 e 269,5 nm (c) e sobreposição dos espectros obtidos (d).



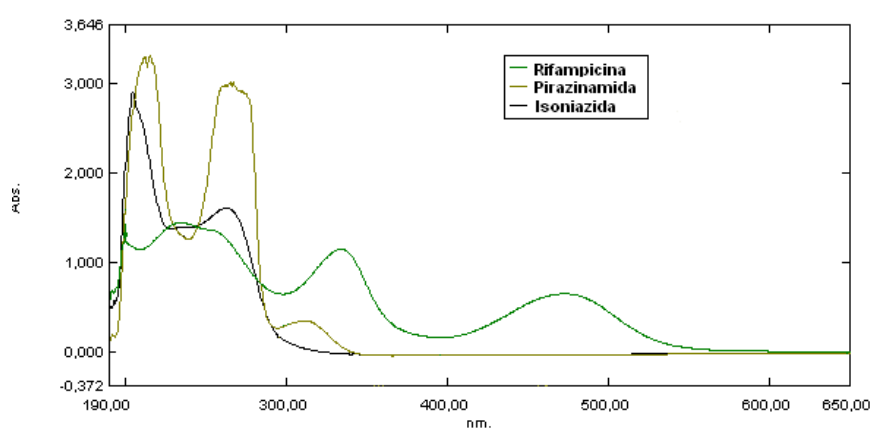
(a)



(b)



(c)



(d)

5.2.7 Pré-condicionamento

O condicionamento é fundamental para manter a consistência da EOF entre cada corrida e como qualquer variação desta pode levar a uma baixa precisão

nos tempos de migração (ALTRIA, 1996; BAKER, 1995), este procedimento se torna fundamental para a precisão do método. O condicionamento comumente utilizado é de um minuto de rinsagem com solução 0,1 N de NaOH o que é suficiente para recompor a parede do capilar seguida de uma rinsagem com o EF antes da injeção para evitar alteração no pH inicial da corrida (ALTRIA; 1996). Este foi o condicionamento inicialmente testado, mas problemas de adsorção da PYR nas paredes do capilar apareceram, então foi necessário realizar uma rinsagem mais drástica utilizando também NaOH 1N por um minuto. Ainda assim, em algumas corridas, o branco apresentou ruído mais intenso no tempo de retenção próximo à PYR. Então para garantir que qualquer traço de PYR fosse removido do capilar foi realizada rinsagem de 2 min com cada solução. Desta forma foi removida a PYR adsorvida no capilar, e desta forma obtida uma boa repetibilidade (ver resultados validação item 5.3.4.1).

Para garantir condições em relação ao capilar uma rinsagem de 10 min com NaOH 1N, seguida de 5 min com água pura, foi realizada a cada dia de trabalho.

5.2.8 Tempo - volume de injeção

Em eletroforese capilar existem três tipos de injeção de amostra, eletro cinético, gravitacional ou hidrodinâmico. A forma de injeção depende do equipamento utilizado. Assim como o equipamento utilizado possui a opção hidrodinâmica, este foi o tipo de injeção utilizada.

Neste tipo de injeção a amostra ingressa ao capilar devido a uma diferença de pressão aplicada sobre o vial que contém a amostra quando o capilar se encontra submerso nele. Os volumes comumente utilizados em EC variam de 1-20 μL . O volume a ser injetado em uma injeção hidrodinâmica depende da variação de pressão exercida e do tempo em que à mesma é aplicada sobre o vial. Este pode ser calculado pela fórmula: $V = \Delta P d^4 \pi t / 128 \eta L$, sendo ΔP a diferença de pressão aplicada (mbar), “d” o diâmetro interno do capilar (μm), “t” o tempo em que o ΔP é aplicado, η a viscosidade do EF e “L” o comprimento do capilar (ALTRIA, 1996).

Para o método em otimização foram testados tempos de injeção de 5, 7 e 9 segundos, os três apresentaram excelentes resultados de resolução (não houve diferenças significativas com as já apresentadas - 7 segundos) e precisão (DPR de área corrigida menor que 2%). Então foi escolhido um tempo intermediário de 7 segundos com o qual já se estava trabalhando.

Foi realizado então o cálculo do volume injetado nas condições escolhidas, assim considerando $\eta=1$, para um tempo de 7 segundos e um ΔP de 50 mbar o volume de injeção é de aproximadamente 0,09 nL.

5.2.9 Utilização do eletrólito de fundo - Reposição

Após varias análises a composição do EF contido no vial de saída, pode ter sido alterado pela migração de íons e da própria eletrolise da água, assim para a melhor repetibilidade é necessário trocar com frequência os viais contendo EF. A frequência de troca recomendada é a cada corrida, mas na prática depende das condições do EF; assim para avaliar a frequência de reposição foi realizada a troca com diferentes frequências, a cada uma, duas, três, quatro, cinco e seis análises. A partir dos resultados, verificando tempo de migração e ruído da linha de base foi definido que o número máximo de análise para cada par de viais contendo tampão é de quatro; a quinta análise começa a apresentar ruído significativo e problemas na reprodutibilidade do t_m .

5.2.10 Cálculo da eficiência

Foi calculado o número de pratos teóricos para cada fármaco quando presente em associação equimolecular; para o método de quantificação por ECL desenvolvido. Os valores encontram-se na tabela 7 a seguir.

TABELA 7 - Valores de eficiência encontrados para cada fármaco quando presentes em associação equimolecular quantificados por ECL.

FÁRMACO	t_m	w	t_m/w	N
ISN	2,92	0,0294	99,51	158429,90
PYR	2,62	0,0864	30,35	14737,76
RIF	3,22	0,0261	123,56	244281,06

Conforme esperado pela própria fórmula da eficiência ($N = 16(t_m/w)^2$) a pirazinamida por ser a primeira a eluir apresenta um número de pratos teóricos menores, analogamente como a rifampicina é a última apresenta um número de pratos teóricos maiores.

5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR ECL PARA QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS REALIZANDO LEITURA EM 269,5 nm.

O método foi validado quanto aos parâmetros: linearidade, seletividade, precisão, exatidão e robustez, os testes foram conduzidos utilizando matéria prima grau farmacêuticos, para o teste de exatidão e linearidade foram utilizados fármacos padrão de referência USP.

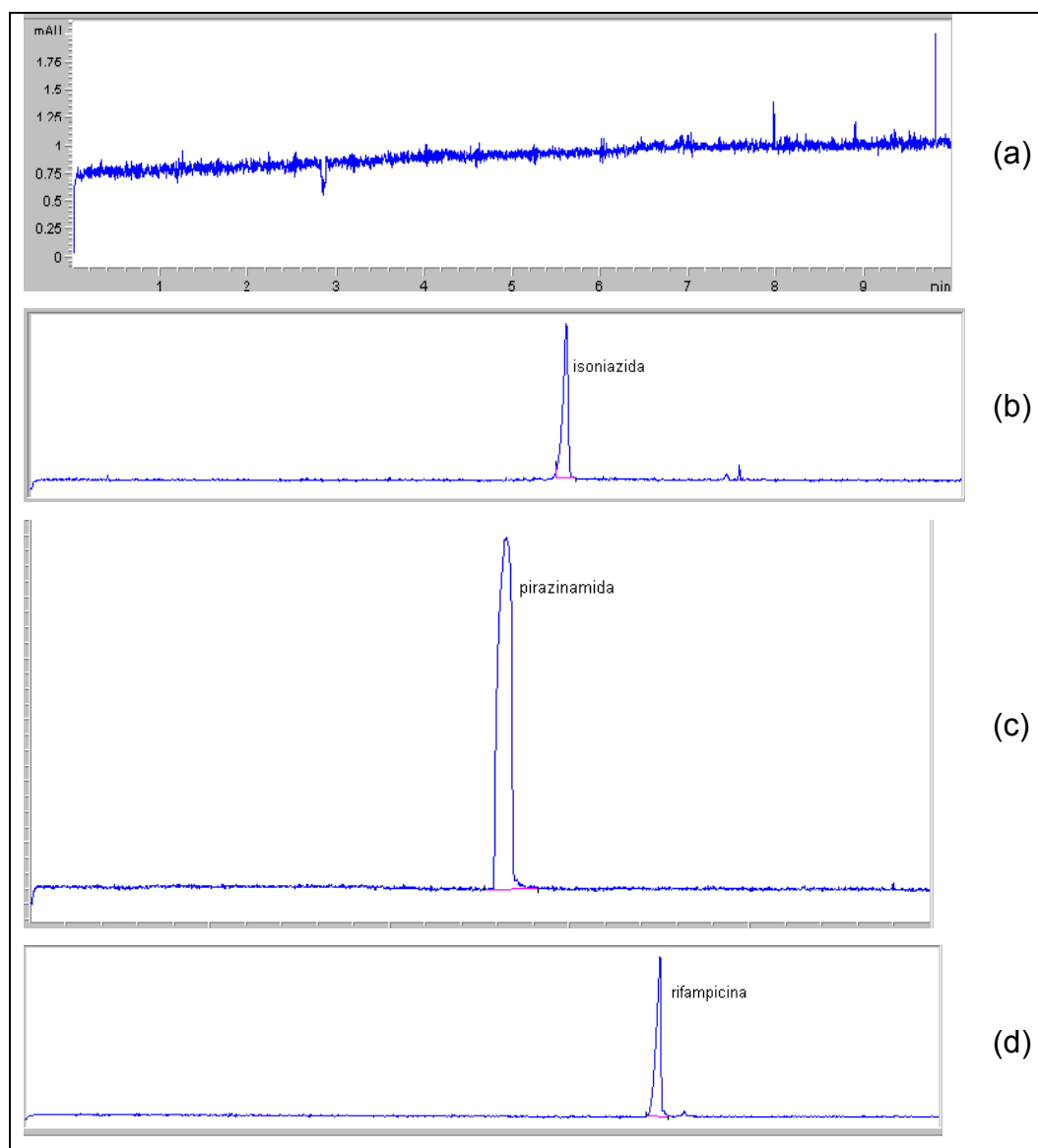
5.3.1 Seletividade

Os eletroferogramas resultantes para placebo e fármacos encontram-se nas figuras 12.

Segundo a RDC 899 (BRASIL, 2003) e a USP (United States Pharmacopeia, 2002), para análise quantitativa, a seletividade pode ser avaliada comparando-se os resultados obtidos da análise do placebo com as do placebo contaminado. Um método é considerado específico quando o placebo não interfere na quantificação dos fármacos.

Como pode ser observado na figura 12, no comprimento de onda utilizado (269,5 nm) para a obtenção dos eletroferogramas, o placebo não apresentou pico de absorção integrável, que pudesse interferir na quantificação dos fármacos nas proporções utilizadas nas formas farmacêuticas estudadas. Isto sugere que o método pode ser considerado específico.

FIGURA 12 - Eletroferograma obtido para o placebo (estearato de magnésio, celulose microcristalina e lactose, 1:1:1) (a), placebo contaminado com ISN 60 $\mu\text{g/ mL}$ (b) placebo contaminado com PYR 60 $\mu\text{g/ mL}$ (c) e RIF 90 $\mu\text{g/ mL}$ (d) - leitura realizada em 269,5 nm.



5.3.2 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada através do gráfico dos resultados de área corrigida com o tempo de migração versus concentração. As concentrações

utilizadas foram de 5 a 120 µg/mL, para cada fármaco. Os resultados são mostrados nas figuras treze (13), quatorze (14) e quinze (15).

FIGURA 13 – Resultado da avaliação da linearidade do método, para isoniazida com sua respectiva equação da reta e coeficiente de correlação. Leitura realizada a 269,5 nm.

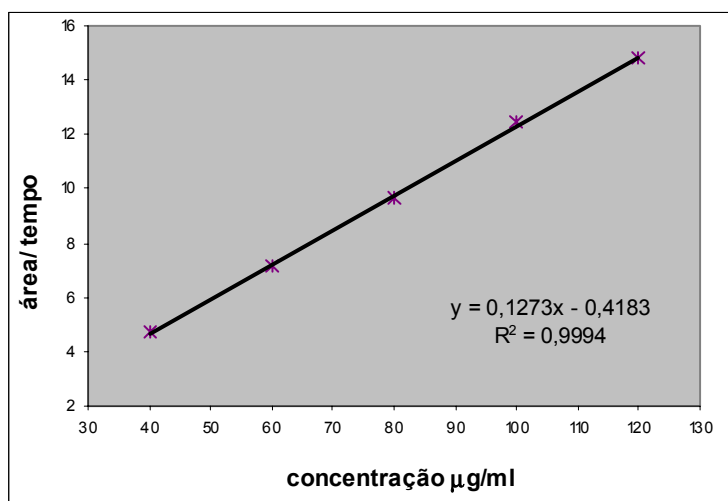


FIGURA 14 - Resultado da avaliação da linearidade do método, para pirazinamida com sua respectiva equação da reta e coeficiente de correlação. Leitura realizada a 269,5 nm.

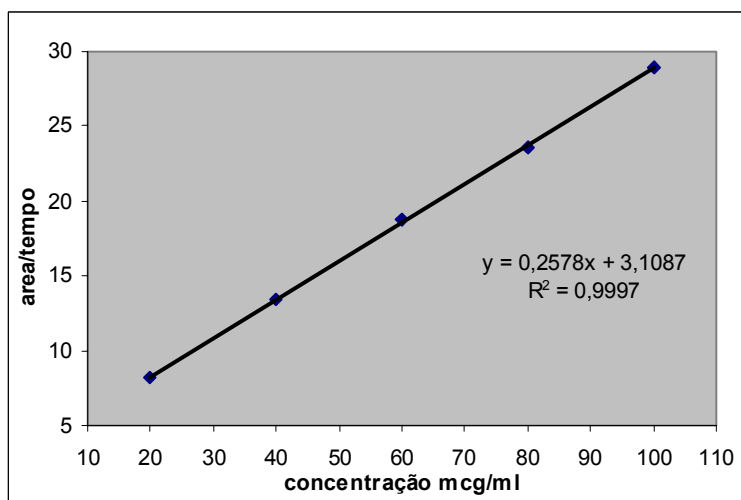
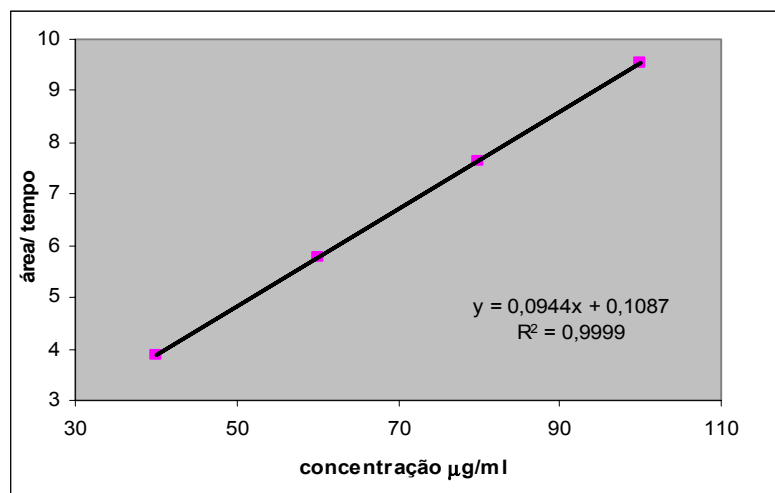


FIGURA 15 - Resultado da avaliação da linearidade do método, para rifampicina com sua respectiva equação da reta e coeficiente de correlação. Leitura realizada a 269,5 nm



Como pode se observar nas figuras 13, 14 e 15, a concentração dentro da qual o método se comporta de forma linear é diferente para cada um dos fármacos, no comprimento de onda utilizado (269,5). Sendo que para a isoniazida, esta compreendida entre 40 e 120 $\mu\text{g/mL}$, para a pirazinamida entre 20 e 120 $\mu\text{g/mL}$ e para a rifampicina entre 60 e 120 $\mu\text{g/mL}$.

Estas diferenças podem ser explicadas pelo fato de ser a pirazinamida, o fármaco que apresenta maior intensidade de absorção molar neste comprimento de onda (figura 11 varredura no UV-vis) seguida da isoniazida e por último a rifampicina. A rifampicina apresenta varias bandas de absorção característica na região espectral entre 200 a 600 nm, com máximos de absorção em 237, 255, 334 e 475 nm, porém todos estes máximos apresentam intensidade menor que aqueles apresentados pelos outros dois fármacos (ISN e PYR), devido a sua baixa absorção molar. O comprimento de onda utilizado para leitura neste ensaio de linearidade, embora pertença a uma região de absorção comum aos três fármacos, não corresponde a nenhum dos comprimentos de onda de absorção máxima para rifampicina, como ocorre para ISN e PYR o que pode ser uma justificativa para sua falta de linearidade em concentrações mais baixas.

5.3.3 Intervalo

O intervalo foi definido dentro da região na qual o método se comportou de forma linear.

Para cada fármaco foi traçado um gráfico de área corrigida versus concentração, a partir dos resultados obtidos para cinco concentrações diferentes no intervalo entre 80 e 120% da concentração considerada ideal para solução teste, a qual foi definida como sendo o ponto central do gráfico obtido para ensaio de linearidade, 60 µg/mL para ISN e PYR e 90 µg/mL para RIF; tendo em consideração as concentrações presentes nas DFC para a ISN foi escolhida uma concentração teste um pouco menor à central de forma a facilitar a quantificação simultânea desta quando em associação com a RIF.

As representações gráficas dos resultados para a definição dos intervalos, para cada fármaco, se encontram nas figuras 16, 17 e 18.

FIGURA 16 – Representação gráfica dos dados de intervalo obtidos para o método de ECL utilizando solução de padrão de referência USP de isoniazida e comprimento de onda de 269,5 nm .

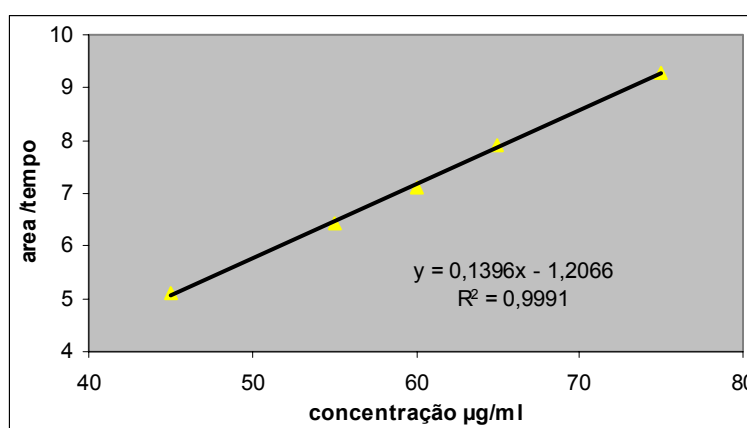


FIGURA 17 - Representação gráfica dos dados de intervalo obtidos para o método de ECL utilizando solução de padrão de referência USP de pirazinamida e comprimento de onda de 269,5 nm.

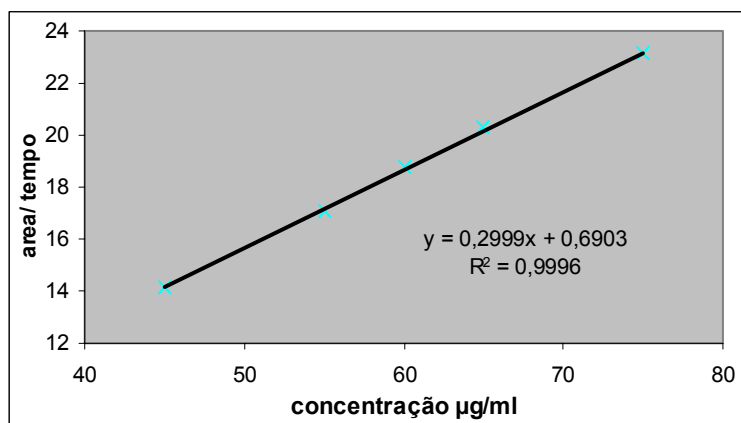
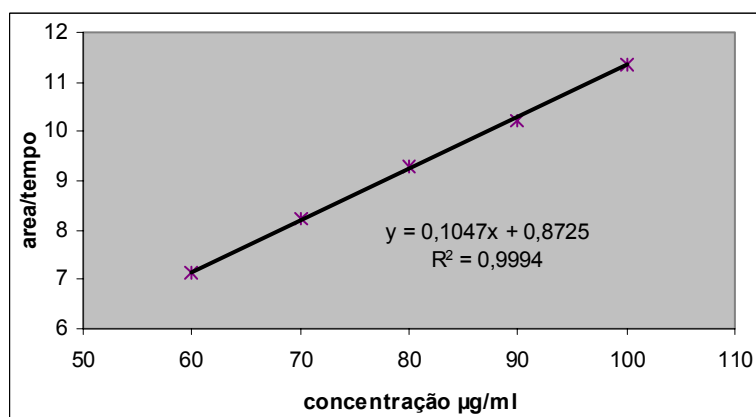


FIGURA 18 - Representação gráfica dos dados de intervalo obtidos para o método de ECL utilizando solução de padrão de referência USP de rifampicina e comprimento de onda de 269,5 nm .



Os resultados obtidos das regressões lineares aplicadas aos resultados da avaliação do intervalo, para os três fármacos dentro da faixa de concentração estudada ($\pm 20\%$ da concentração ideal de trabalho) se enquadram dentro dos limites estabelecidos pela legislação vigente, que exige um coeficiente de

determinação (R^2) maior que 0,99, como critério mínimo aceitável (BRASIL, 2003); segundo proposto por Shabir (2003) podem ser consideradas como ideais por apresentar correlação maior a 0,999.

Os valores obtidos para R^2 , na avaliação do intervalo foram semelhantes àqueles obtidos na avaliação da linearidade, demonstrando que esses resultados são coerentes.

5.3.4 Precisão.

O ensaio de precisão foi realizado para os fármacos isolados e em mistura equimolecular e avaliado quanto à repetibilidade e precisão intermediária.

5.3.4.1 Repetibilidade

Na determinação da precisão intra-dia (Repetibilidade) foram avaliados os DPR dos valores obtidos para área, tempo e área corrigida tanto para os fármacos isolados quanto para a associação equimolecular. Os resultados encontram-se nas tabelas 8 e 9.

A repetibilidade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição e deve ser expressa em termos de desvio padrão relativo, normalmente, métodos que quantificam macro quantidades requerem um DPR de 1 a 2% (RIBANI, 2004). Segundo os limites estipulados pela legislação e outros autores (LEITE, 2002; LANÇAS, 2004), o método em questão satisfaz o critério de repetibilidade tanto para as amostras isoladas (tabela 8) quanto para a associação equimolecular dos três fármacos (tabela 9), pois apresenta DPR menor que 5%, para cada parâmetro avaliado (área, área corrigida, tempo de migração), podendo ser considerado adequado às exigências da legislação nacional vigente (BRASIL, 2003).

Um dos parâmetros mais importantes em um método eletroforético é a resolução dos componentes da amostra, por essa razão é importante avaliar a sua repetibilidade, pois não basta apenas o tempo e a área corrigida serem reprodutíveis se não há separação efetiva entre os componentes da amostra. Os valores encontrados para resolução apresentam um DPR menor que 2%, tanto para a resolução entre PYR e ISN como para ISN e RIF, o que reflete a boa repetibilidade do método, mesmo quando os fármacos se encontram em associação.

TABELA 8 – Resultado da avaliação da repetibilidade: valores de área, tempo, área corrigida e DPR, para isoniazida 60 µg/mL, pirazinamida 60 µg/mL e rifampicina 90 µg/mL.

ISONIAZIDA					
AREA	DPR A	TEMPO	DPRT	A/T	DPR A/T
25,0		3,5		7,14	
25,2		3,4		7,41	
25,2		3,4		7,41	
25,4		3,5		7,26	
24,8	1,17	3,4	1,53	7,29	1,16
25,7		3,5		7,34	
25,0		3,4		7,35	
25,6		3,5		7,31	
25,4		3,5		7,26	
PIRAZINAMIDA					
49,8		2,7		18,44	
48,1		2,6		18,50	
48,3		2,6		18,58	
49,0		2,6		18,85	
48,5	1,07	2,6	1,90	18,65	1,77
49,0		2,6		18,85	
48,3		2,6		18,58	
48,5		2,7		17,96	
48,5		2,7		17,96	
RIFAMPICINA					
34,2		3,4		10,06	
34,3		3,3		10,39	
35,6		3,4		10,47	
34,8		3,4		10,24	
35,2	1,72	3,4	1,49	10,35	1,87
35,5		3,4		10,44	
34,2		3,3		10,36	
35,3		3,4		10,38	
35,6		3,3		10,79	

TABELA 9 Resultado da avaliação da repetibilidade: valores de área, tempo, área corrigida, resolução e respectivos DPR para os três fármacos em mistura equimolecular 70 µg/ml.

PIRAZINAMIDA				PYR-ISON		ISONIAZIDA			ISON-RIF		RIFAMPICINA		
AREA	TEMPO	A/T		Rs		AREA	TEMPO	A/T	Rs		AREA	TEMPO	A/T
57,3	2,6	22,04		5,190		25,8	2,9	8,90	10,929		25,8	3,2	8,06
57,7	2,6	22,19		5,199		24,6	2,9	8,48	10,989		26,4	3,2	8,25
58,1	2,6	22,35		5,172		25,7	2,9	8,86	10,949		25,8	3,2	8,06
56,9	2,6	21,88		5,231		25,5	2,9	8,79	10,989		26,5	3,2	8,28
56,1	2,6	21,58		5,111		25,4	2,9	8,76	10,638		25,7	3,2	8,03
57,2	2,7	21,19		5,150		26,3	3,0	8,77	10,417		26,1	3,3	7,91
59,1	2,7	21,89		5,208		25,8	3,0	8,60	10,753		26,5	3,3	8,03
58,3	2,6	22,42		5,190		24,9	2,9	8,59	10,811		26,4	3,2	8,25
57,7	2,6	22,19		5,150		24,9	2,9	8,59	10,949		25,7	3,2	8,03
DPR	1,50	1,68	1,79	0,70		2,14	1,51	1,65	1,80		1,35	1,37	1,58

5.3.4.2 Precisão intermediária

Para avaliação da precisão intermediária foram realizadas análises em dois dias consecutivos; os resultados obtidos foram comparados para verificar a concordância entre os mesmos; os parâmetros avaliados foram: tempo e área corrigida. Os resultados obtidos para os fármacos isolados e em mistura equimolecular encontram-se na tabela 10 e 11.

Para estes parâmetros de precisão a literatura apresenta limites de até 5% para tempo de migração e maiores que 2% para área corrigida (WEI, 2005; PEREIRA, 2005) sendo assim, os valores encontrados para os fármacos isolados e em associação são satisfatórios permanecendo dentro do intervalo proposto por Altria em 1996 (0,5 - 2%) e superando o limite especificado pela legislação nacional (BRASIL, 2003).

TABELA 10 – Resultado da avaliação da precisão intermediária: valores de área, tempo, área corrigida e DPR, para isoniazida 60 µg/mL, pirazinamida 60 µg/mL e rifampicina 90 µg/mL.

FÁRMACO	DIA 1			DIA 2			COMPARAÇÃO	
	ÁREA	TEMPO	A/T	ÁREA	TEMPO	A/T	DPR T	DPR A/T
PIRAZINAMIDA	49,8	2,7	18,44	49,6	2,7	18,37	1,92	1,42
	48,1	2,6	18,50	48,9	2,6	18,81		
	48,3	2,6	18,58	49,3	2,7	18,26		
	49,0	2,6	18,85	49,7	2,7	18,41		
	48,5	2,6	18,65	48,1	2,6	18,50		
	49,0	2,6	18,85	49,5	2,7	18,33		
	48,3	2,6	18,58	49,7	2,7	18,41		
	48,5	2,7	17,96	48,6	2,6	18,69		
	48,5	2,7	17,96	49,2	2,7	18,22		
DPR	1,07	1,90	1,77	1,12	1,88	1,05		
ISONIAZIDA	21,4	3,0	7,14	22,3	2,9	7,69	1,64	1,85
	21,5	2,9	7,41	21,9	2,9	7,55		
	22,3	3,0	7,43	21,9	3,0	7,30		
	21,0	2,9	7,24	22,6	3,0	7,53		
	21,9	3,0	7,30	22,4	3,0	7,47		
	22,0	3,0	7,33	21,8	3,0	7,27		
	22,1	3,0	7,37	21,8	3,0	7,27		
	21,2	2,9	7,31	22,3	3,0	7,43		
	21,8	3,0	7,27	21,8	2,9	7,52		
DPR	2,01	1,69	1,24	1,40	1,69	1,95		
RIFAMPICINA	34,2	3,4	10,06	35,7	3,4	10,50	1,98	1,63
	34,3	3,3	10,39	35,5	3,5	10,14		
	35,6	3,4	10,47	36,8	3,5	10,51		
	34,8	3,4	10,24	35,3	3,4	10,38		
	35,2	3,4	10,35	36,3	3,5	10,37		
	35,5	3,4	10,44	36,6	3,5	10,46		
	34,2	3,3	10,36	35,8	3,4	10,53		
	35,3	3,4	10,38	37,2	3,5	10,63		
	35,6	3,3	10,79	36,0	3,4	10,59		
DPR	1,72	1,49	1,87	1,76	1,53	1,39		

TABELA 11 – Resultado da avaliação da precisão intermediária: valores de área, tempo, área corrigida e DPR, para os três fármacos em mistura equimolecular 70 µg/mL.

FÁRMACO	DIA 1			DIA 2			COMPARAÇÃO	
	ÁREA	TEMPO	A/T	ÁREA	TEMPO	A/T	DPR T	DPR A/T
PIRAZINAMIDA	57,8	2,6	22,04	56,8	2,7	21,65	1,63	1,61
	57,7	2,6	22,19	56,7	2,6	21,81		
	58,1	2,6	22,35	57,8	2,6	22,04		
	56,9	2,6	21,88	55,9	2,6	21,50		
	56,1	2,6	21,58	55,6	2,6	21,38		
	57,2	2,7	21,19	58,2	2,7	21,56		
	59,1	2,7	21,89	58,2	2,7	21,56		
	58,8	2,6	22,42	57,3	2,6	22,04		
	57,7	2,6	22,19	57,5	2,6	22,19		
DPR	1,50	1,62	1,79	1,67	1,68	1,31		
ISONIAZIDA	25,8	2,9	8,90	24,8	2,9	8,55	1,46	1,75
	24,6	2,9	8,48	25,6	2,9	8,83		
	25,7	2,9	8,86	25,0	2,9	8,62		
	25,5	2,9	8,79	24,5	2,9	8,45		
	25,4	2,9	8,76	25,4	2,9	8,76		
	26,3	3,0	8,77	25,3	3,0	8,43		
	25,8	3,0	8,60	25,8	3,0	8,60		
	24,9	2,9	8,59	24,6	2,9	8,48		
	24,9	2,9	8,59	24,6	2,9	8,48		
DPR	2,14	1,51	1,65	1,90	1,51	1,62		
RIFAMPICINA	25,8	3,2	8,06	26,8	3,2	8,38	1,33	1,81
	26,4	3,2	8,25	26,4	3,2	8,25		
	25,8	3,2	8,06	26,8	3,2	8,38		
	26,5	3,2	8,28	26,5	3,2	8,28		
	25,7	3,2	8,03	26,7	3,2	8,34		
	26,1	3,3	7,91	27,1	3,3	8,21		
	26,5	3,3	8,03	27,2	3,3	8,24		
	26,4	3,2	8,25	26,4	3,2	8,25		
	25,7	3,2	8,03	25,4	3,2	7,94		
DPR	1,35	1,37	1,58	1,99	1,37	1,60		

5.3.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo ensaio de recuperação no qual uma quantidade conhecida de analito (fármaco) é adicionada à mistura sintética dos componentes da forma farmacêutica (placebo). Os valores obtidos para este ensaio encontram-se na tabela 12.

TABELA 12 – Valores encontrados para avaliação de exatidão por ensaio de recuperação.

Isoniazida			Pirazinamida			Rifampicina		
Cc nominal	Média cc. experimental	%	Cc nominal	Média cc. experimental	%	Cc nominal	Média cc. experimental	%
57,1	57,8 56,5 55,9 56,7	99,30	51,9	51,6 49,8 50,9 50,8	97,88	45,4	44,5 45,6 45,9 45,3	99,78
64,4	65,2 63,8 63,1 64,0	99,38	59,6	60,3 58,2 59,1 59,2	99,33	72,6	71,7 73,3 71,4 72,1	99,31
72,8	72,7 71,8 71,0 71,8	98,63	69,6	70,4 68,6 68,1 69,0	99,14	86,4	87,1 85,8 85,2 86,0	99,54
média	—	99,10	—	—	98,78	—	—	99,54
DPR		0,41			0,70			0,24

Destacado em **negrito** os valores das médias.

Na maioria dos procedimentos analíticos de validação, recuperação dentro da faixa 70% a 120% são aceitas (ICH, 2005; LANÇAS, 2004). As médias das percentagens de recuperação obtidas foram muito próximas de 100% ($99,1 \pm 0,41$ para ISN, $98,8 \pm 0,70$ para PYR e $99,5 \pm 0,24$ para RIF) e os valores de DPR menores que 2,00% indicam que o método desenvolvido apresenta exatidão adequada para quantificação dos fármacos.

5.3.6 Robustez

O ensaio de robustez mede a confiabilidade do método em condições normais de operação, permitindo fixar as tolerâncias dos parâmetros críticos do método.

Cada parâmetro é avaliado em um intervalo de ± 5 -10% do valor estipulado para o método (ALTRIA, 1996) No ensaio de robustez foram avaliados os parâmetros: temperatura de corrida e pH do eletrólito de fundo. As figuras 19 e 20 apresentam os resultados da influencia destes parâmetros na resolução entre os fármacos. Os resultados encontrados para a influência destes parâmetros sob área e tempo de migração são mostrados nas tabelas 13 e 14.

Como pode ser observado nas figuras (19 e 20) os valores de resolução não sofreram modificações significativas com as alterações de pH e temperatura testadas, tendo em vista que pertencem a mesma distribuição segundo o teste de Dixon (Q_{10} tabelado: 0,97), pois para variações de temperatura, os valores de Q_{10} foram de PYR-ISON Q_{10} : 0,52 ; ISN-RIF Q_{10} :0,026; e para variações de pH foram PYR-ISON Q_{10} :0,96 ; ISN-RIF Q_{10} :0,80 (CIENFUEGOS, 2005).

FIGURA 19 – Resultados da avaliação da influência da alteração de pH em $\pm 0,2$ unidades na resolução eletroforética entre pirazinamida e isoniazida (Série 1) e isoniazida e rifampicina (Série 2).

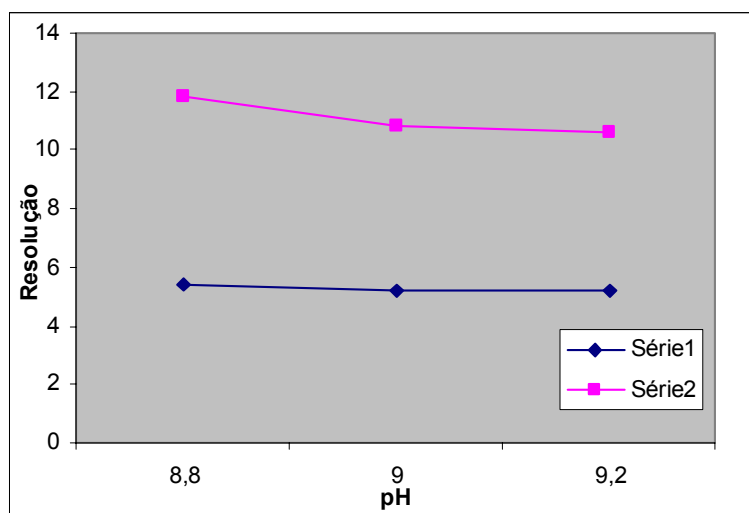
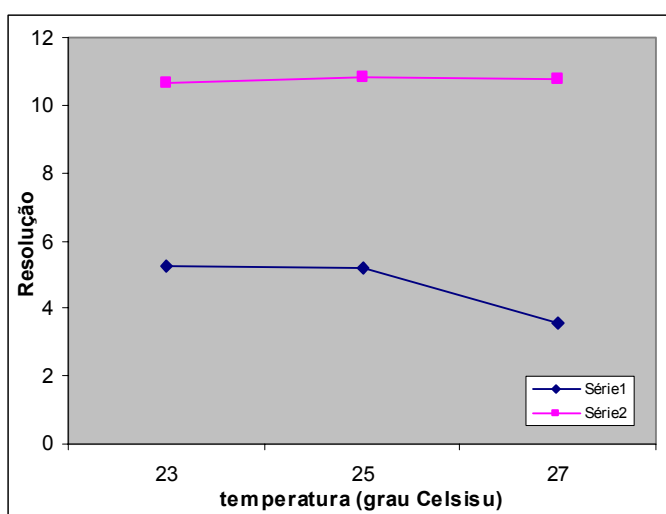


FIGURA 20 – Resultado da avaliação da influência da alteração de temperatura em ± 2 unidades na resolução eletroforética entre pirazinamida e isoniazida (Série 1) e isoniazida e rifampicina (Série 2).



As diferenças encontradas para área corrigida nas diferentes condições testadas apresentaram valores de DPR menores que 2% (tabelas 13 e 14), que podem ser considerados muito bons para EC (BAKER, 1995).

Este método possui robustez intrínseca, segundo definido por Ribani et al. (2004), pois a validação foi conduzida em um local diferente ao de seu desenvolvimento, utilizando um outro equipamento e solventes de lote diferente.

TABELA 13 – Resultados da avaliação da robustez, para variações de $\pm 0,2$ unidades de pH no EF, sobre os valores de área, tempo, área corrigida e DPR para os fármacos em associação equimolecular.

pH	PIRAZINAMIDA				ISONIAZIDA				RIFAMPICINA			
	AREA	T	A/T	DPR A/T	AREA	T	A/T	DPR A/T	AREA	T	A/T	DPR A/T
8,8	60,9	2,7	22,6	1,70	25,3	3,0	8,4	1,83	27,3	3,3	8,27	1,40
	57,6	2,5	23,0		24,6	2,8	8,8		25,7	3,1	8,29	
	57,4	2,5	23,0		24,3	2,8	8,7		24,9	3,1	8,03	
	59,8	2,7	22,1		26,0	3,0	8,7		26,9	3,3	8,15	
	61,4	2,7	22,7		26,5	3,0	8,8		26,3	3,3	7,97	
	56,4	2,5	22,6		24,6	2,8	8,8		25,5	3,1	8,23	
	56,4	2,5	22,6		24,3	2,8	8,7		25,6	3,1	8,26	
	61,4	2,7	22,7		25,4	3,0	8,5		27,3	3,3	8,27	
	58,9	2,7	21,8		25,3	3,0	8,4		27,1	3,3	8,21	
9,0	57,3	2,6	22,04	1,79	25,8	2,9	8,9	1,65	25,8	3,2	8,06	1,58
	57,7	2,6	22,19		24,6	2,9	8,5		26,4	3,2	8,25	
	58,1	2,6	22,35		25,7	2,9	8,9		25,8	3,2	8,06	
	56,9	2,6	21,88		25,5	2,9	8,8		26,5	3,2	8,28	
	56,1	2,6	21,58		25,4	2,9	8,8		25,7	3,2	8,03	
	57,2	2,7	21,19		26,3	3,0	8,8		26,1	3,3	7,91	
	59,1	2,7	21,89		25,8	3,0	8,6		26,5	3,3	8,03	
	58,3	2,6	22,42		24,9	2,9	8,6		26,4	3,2	8,25	
	57,7	2,6	22,19		24,9	2,9	8,6		25,7	3,2	8,03	
9,2	57,7	2,6	22,2	2,09	24,1	2,9	8,3	1,83	26,2	3,2	8,19	1,69
	57,3	2,7	21,2		24,5	3,0	8,2		26	3,3	7,88	
	58,4	2,6	22,5		24,6	2,9	8,5		25,8	3,2	8,06	
	57,6	2,6	22,2		24,1	2,9	8,3		26,7	3,2	8,34	
	57,7	2,6	22,2		24,1	2,9	8,3		25,8	3,2	8,06	
	55,8	2,6	21,5		23,5	2,9	8,1		26,3	3,2	8,22	
	56,2	2,6	21,6		23,4	2,9	8,1		25,5	3,2	7,97	
	57,5	2,7	21,3		24,3	3,0	8,1		26,7	3,3	8,09	
	58,2	2,7	21,6		24,1	3,0	8,0		26,7	3,3	8,09	

TABELA 14 – Resultados da avaliação da robustez, para variações de ± 2 °C na temperatura de análise, sobre os valores de área, tempo, área corrigida e DPR para os fármacos em associação equimolecular.

°C	PIRAZINAMIDA				ISONIAZIDA				RIFAMPICINA			
	AREA	T	A/T	DPR A/T	AREA	T	A/T	DPR A/T	AREA	T	A/T	DPR A/T
23	57,5	2,6	22,1	1,87	23,5	2,9	8,1	1,39	26,1	3,2	8,16	1,60
	58,9	2,7	21,8		24,6	3,0	8,2		26,4	3,3	8,00	
	56,8	2,7	21,0		24,8	3,0	8,3		25,8	3,3	7,82	
	57,5	2,7	21,3		24,3	3,0	8,1		26,8	3,3	8,12	
	56,9	2,7	21,1		24,8	3,0	8,3		26,7	3,3	8,09	
	58,7	2,7	21,7		25,0	3,0	8,3		27,3	3,3	8,27	
	57,3	2,6	22,0		24,3	2,9	8,4		25,7	3,2	8,03	
	57,7	2,7	21,4		25,3	3,0	8,4		27,0	3,3	8,18	
	58,9	2,7	21,8		24,9	3,0	8,3		26,8	3,3	8,12	
25	57,3	2,6	22,04	1,79	25,8	2,9	8,9	1,65	25,8	3,2	8,06	1,58
	57,7	2,6	22,19		24,6	2,9	8,5		26,4	3,2	8,25	
	58,1	2,6	22,35		25,7	2,9	8,9		25,8	3,2	8,06	
	56,9	2,6	21,88		25,5	2,9	8,8		26,5	3,2	8,28	
	56,1	2,6	21,58		25,4	2,9	8,8		25,7	3,2	8,03	
	57,2	2,7	21,19		26,3	3,0	8,8		26,1	3,3	7,91	
	59,1	2,7	21,89		25,8	3,0	8,6		26,5	3,3	8,03	
	58,3	2,6	22,42		24,9	2,9	8,6		26,4	3,2	8,25	
	57,7	2,6	22,19		24,9	2,9	8,6		25,7	3,2	8,03	
27	50,8	2,5	20,3	1,59	22,3	2,7	8,3	1,62	24,4	3,0	8,13	1,66
	51,6	2,5	20,6		22,6	2,7	8,4		23,6	3,0	7,87	
	53,1	2,5	21,2		21,7	2,7	8,0		23,9	3,0	7,97	
	51,9	2,5	20,8		22,3	2,7	8,3		24,7	3,0	8,23	
	53,6	2,6	20,6		22,7	2,8	8,1		25,0	3,1	8,06	
	52,8	2,5	21,1		22,8	2,7	8,4		24,9	3,0	8,30	
	53,4	2,6	20,5		23,0	2,8	8,2		25,3	3,1	8,16	
	51,6	2,5	20,6		22,3	2,7	8,3		24,6	3,0	8,20	
	53,1	2,5	21,2		22,7	2,7	8,4		24,3	3,0	8,10	

5.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR ECL PARA QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS REALIZANDO LEITURA PARA CADA UM DELES NO SEU COMPRIMENTO DE ONDA IDEAL.

Até aqui foram discutidos os parâmetros de validação do método por eletroforese capilar utilizando para detecção e quantificação dos três fármacos um comprimento de onda comum (269,5 nm).

Tendo em vista que o comprimento de onda ideal para análise de cada fármaco é diferente, os testes para validação do método foram também realizados nos seguintes comprimentos de onda: 263,5 para ISN, 269,5 para PYR e 334,5 para RIF. Estes testes foram realizados a fim de verificar se, considerando o comprimento de onda ideal para cada fármaco, o método apresentava alguma melhoria nos parâmetros de validação, quando comparado aos parâmetros obtidos quando realizado utilizando um comprimento de onda comum aos três fármacos.

As figuras 21, 22 e 23 e as tabelas 15 e 16 apresentam os resultados obtidos para os testes de: linearidade, precisão e exatidão.

FIGURA 21 – Resultado da avaliação da linearidade do método, com sua respectiva equação da reta e coeficiente de correlação para isoniazida a 263,5 nm.

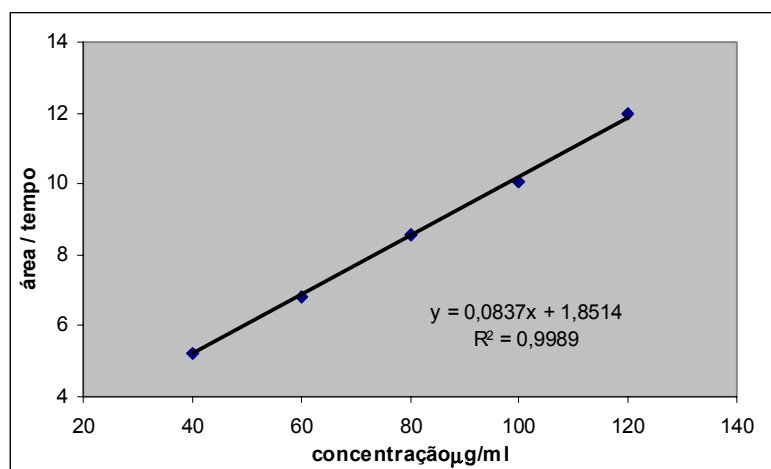


FIGURA 22 – Resultado da avaliação da linearidade do método, com sua respectiva equação da reta e coeficiente de correlação para pirazinamida a 269,5 nm

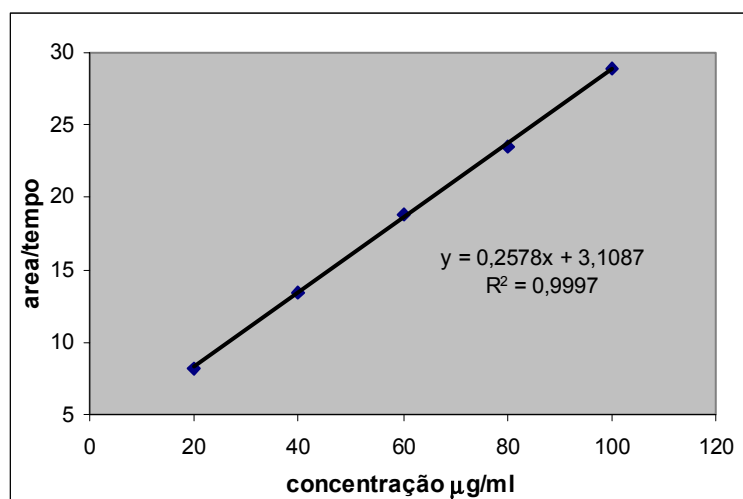


FIGURA 23 – Resultado da avaliação da linearidade do método, com sua respectiva equação da reta e coeficiente de correlação para rifampicina a 334,5 nm.

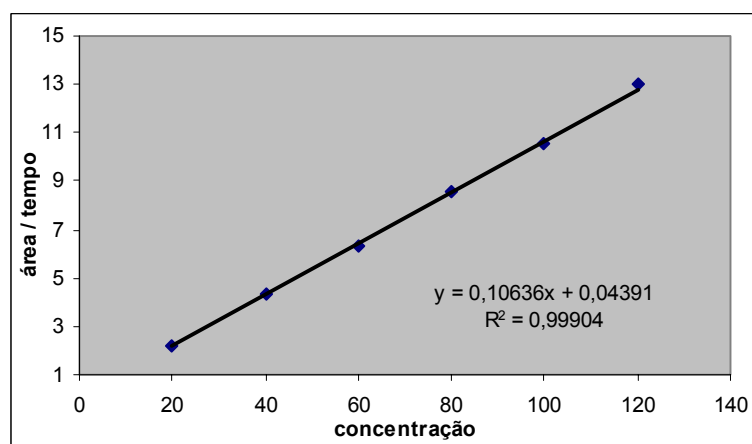


TABELA 15 – Resultado da avaliação da repetibilidade: valores de área, tempo, área corrigida e DPR, para isoniazida 60 µg/mL (263,5 nm), pirazinamida 60 µg/mL (269,5 nm) e rifampicina 90 µg/mL (334,5 nm).

ISONIAZIDA					
AREA	DPR A	TEMPO	DPRT	A/T	DPR A/T
20,0		2,9		6,90	
19,8		3,0		6,60	
20,3		3,0		6,77	
20,6		3,1		6,65	
20,1	1,71	3,0	1,68	6,70	1,36
20,5		3,0		6,83	
20,3		3,0		6,77	
19,7		2,9		6,79	
20,3		3,0		6,77	
PIRAZINAMIDA					
49,8		2,7		18,44	
48,1		2,6		18,50	
48,3		2,6		18,58	
49,0		2,6		18,85	
48,5	1,07	2,6	1,90	18,65	1,77
49,0		2,6		18,85	
48,3		2,6		18,58	
48,5		2,7		17,96	
48,5		2,7		17,96	
RIFAMPICINA					
38,6		3,4		11,35	
37,7		3,3		11,42	
38,7		3,3		11,73	
39,7		3,4		11,68	
38,5	1,38	3,3	1,63	11,67	1,34
38,7		3,4		11,38	
38,5		3,4		11,32	
37,7		3,3		11,42	
37,6		3,3		11,39	

TABELA 16 – Resultado da avaliação da precisão intermediária: valores de área, tempo, área corrigida e DPR, para isoniazida 60 µg/mL (263,5 nm), pirazinamida 60 µg/mL (269,5 nm) e rifampicina 90 µg/mL (334,5 nm).

FÁRMACO	DIA 1			DIA 2			COMPARAÇÃO	
	ÁREA	TEMPO	A/T	ÁREA	TEMPO	A/T	DPR T	DPR A/T
PIRAZINAMIDA	49,8	2,7	18,44	49,6	2,7	18,37	1,92	1,42
	48,1	2,6	18,50	48,9	2,6	18,81		
	48,3	2,6	18,58	49,3	2,7	18,26		
	49,0	2,6	18,85	49,7	2,7	18,41		
	48,5	2,6	18,65	48,1	2,6	18,50		
	49,0	2,6	18,85	49,5	2,7	18,33		
	48,3	2,6	18,58	49,7	2,7	18,41		
	48,5	2,7	17,96	48,6	2,6	18,69		
	48,5	2,7	17,96	49,2	2,7	18,22		
DPR	1,07	1,90	1,77	1,12	1,88	1,05		
ISONIAZIDA	20,0	2,9	6,90	20,5	3,0	6,83	1,94	1,35
	19,8	3,0	6,60	21,3	3,1	6,87		
	20,3	3,0	6,77	20,6	3,0	6,87		
	20,6	3,1	6,65	21,4	3,1	6,90		
	20,1	3,0	6,70	20,8	3,0	6,93		
	20,5	3,0	6,83	20,3	3,0	6,77		
	20,3	3,0	6,77	20,7	3,1	6,68		
	19,7	2,9	6,79	20,3	3,0	6,77		
	20,3	3,0	6,77	20,5	3,0	6,83		
DPR	1,71	1,68	1,36	1,92	1,65	1,16		
RIFAMPICINA	32,6	3,4	9,59	31,3	3,3	9,48	1,53	1,45
	31,7	3,3	9,61	32,1	3,4	9,44		
	31,7	3,3	9,61	31,6	3,3	9,58		
	33,7	3,4	9,91	32,8	3,4	9,65		
	32,8	3,3	9,94	32,5	3,3	9,85		
	32,7	3,4	9,62	31,5	3,3	9,55		
	32,5	3,4	9,56	32,5	3,4	9,56		
	31,7	3,3	9,61	32,5	3,4	9,56		
	31,6	3,3	9,58	31,3	3,3	9,48		
DPR	1,73	1,72	1,53	1,84	1,58	1,26		

Analisando os resultados, pode se concluir que não há vantagem em realizar a detecção em comprimentos de onda diferentes, pois a linearidade, precisão e exatidão, não apresentaram melhorias evidentes nestes parâmetros.

A única melhora evidente é a possibilidade de quantificação da rifampicina em concentrações menores, mas como se trata de um método para quantificação de fármacos em forma farmacêutica isolada ou em associação, o limite de quantificação não é relevante.

5.5 ADEQUAÇÃO DO SISTEMA, TEOR DE ISONIAZIDA E RIFAMPICINA EM ASSOCIAÇÃO NO COMPRIMIDO.

A adequação do sistema visa verificar a validação do instrumento e da metodologia analítica simultaneamente; o objetivo do teste é mostrar que o método apresenta precisão e exatidão iguais ou melhores no sistema em teste do que os obtidos durante a validação (LANÇAS, 2004).

A adequação do sistema foi testada na quantificação dos fármacos ISN e RIF, na forma farmacêutica comprimido. Cada comprimido possuía valor declarado de 100 mg de ISN e 150 mg de RIF, proporção esta recomendada pelo protocolo brasileiro para tratamento da tuberculose.

A precisão inter e intra dia foi avaliada quanto a tempo de migração e valores de área corrigida encontrados entre o primeiro e segundo dia de trabalho; o parâmetro de comparação foi o DPR cujos valores foram menores que 2%, confirmando a boa precisão inter e intra dia do método e permanecendo dentro dos níveis considerados ideais para EC. A tabela 17 apresenta os resultados encontrados para ISN e RIF respectivamente.

TABELA 17 - Resultado da avaliação da precisão inter e intra dia: valores de área, tempo, área corrigida e DPR, para isoniazida (50 µg/mL) e rifampicina (75 µg/mL). na DFC.

FÁRMACO	DIA 1			DIA 2			DPR T	DPR A/T
	ÁREA	TEMPO	A/T	ÁREA	TEMPO	A/T		
ISONIAZIDA	17,3	3,0	5,77	16,9	3,0	5,63	1,71	1,41
	16,7	3,0	5,57	17,8	3,1	5,74		
	17,2	3,1	5,55	17,3	3,1	5,58		
	16,8	3,0	5,60	17,3	3,1	5,58		
	16,8	3,0	5,60	17,2	3,0	5,73		
	17,5	3,1	5,65	17,8	3,1	5,74		
DPR	1,70		1,40	1,69		1,41		
RIFAMPICINA	26,4	3,2	8,25	26,8	3,2	8,38	1,61	1,66
	26,5	3,2	8,28	26,5	3,3	8,03		
	27,2	3,3	8,24	27,3	3,3	8,27		
	26,1	3,2	8,16	27,3	3,3	8,27		
	27,2	3,2	8,50	25,8	3,2	8,06		
	26,8	3,3	8,12	26,7	3,3	8,09		
DPR	1,60		1,61	1,58		1,72		

A partir das médias encontradas para área corrigida é possível calcular a concentração presente no fármaco utilizando a equação da reta obtida para cada fármaco. Assim a concentração encontrada para ISN é de 49,25 µg/mL e para RIF 69,89 µg/mL o que corresponde a 98,5 mg de ISN e 139,78 mg de RIF na forma farmacêutica, ou em outras palavras 98,5% e 93,2% do valor declarado para ISN e RIF respectivamente. Resultados estes que estão de acordo como especificado para o doseamento desta forma farmacêutica conforme especificado na USP 29, 2006.

A resolução serve para determinar o poder de separação do sistema para um par de analíticos de interesse. Como já discutido, é um dos parâmetros de avaliação mais importantes da eletroforese capilar, o qual deve ser avaliado quanto à precisão. Os resultados que figuram na tabela 18 mostram que o método possui boa precisão para resolução, quando avaliado inter e intra dia, pois o valor de DPR é menor que 2%.

TABELA 18 – Resultados obtidos para resolução encontrados para os fármacos ISN e RIF presentes no comprimido, e sua respectiva DPR.

DIA 1			DIA 2		
ΔT	w1+w2	Rs	ΔT	w1+w2	Rs
0,2	0,0532	7,52	0,2	0,0548	7,30
0,2	0,0525	7,62	0,2	0,0567	7,05
0,2	0,0544	7,35	0,2	0,0552	7,25
0,2	0,0538	7,43	0,2	0,0560	7,14
0,2	0,0530	7,55	0,2	0,0546	7,32
00,2	0,0536	7,46	0,2	0,0555	7,21
DPR		1,24,	DPR		1,40

5.6 COMPARAÇÃO COM MÉTODO POR CLAE

CLAE é hoje em dia uma das técnicas mais utilizadas para controle de qualidade na área farmacêutica é com ela que a eletroforese capilar disputa espaço, pois ambas são aplicadas para análise de substâncias solúveis; sendo assim o

desafio do método aqui apresentado será frente a um método já validado para a mesma associação utilizando CLAE.

5.6.1 Cromatografia líquida de alta eficiência.

A fim de realizar a comparação do novo método desenvolvido frente a outro já estabelecido, foi realizada a quantificação dos fármacos presentes na associação por CLAE segundo proposto por CALLERI et al. (2002) com algumas modificações.

Os resultados de área obtidos para os fármacos contidos no comprimido (isoniazida e rifampicina) utilizando este método encontram-se na tabela 19, junto às respectivas médias e DPR. A partir destas médias foi realizada a quantificação dos fármacos, por comparação com os fármacos padrão referência USP utilizados. Os resultados encontrados indicam uma concentração de $141,29 \pm 1,49$ mg de RIF e $96,53 \pm 1,48$ mg de ISN; o que corresponde a 94,19% e 96,53% do valor declarado para o comprimido contendo esta associação.

TABELA 19 - Resultados obtidos após análise por CLAE: valores de área, área média e DPR de ISN e RIF padrão referência USP (p) e na forma farmacêutica (cpr).

	ISN p	RIFp	ISN cpr	RIFcp
ÁREAS	192595	7157011	256348	6899196
	195544	7247140	247990	6676197
	196947	7083530	248701	6664153
MÉDIA	195029	7162560	251013	6746515
DPR	1,18	1,14	1,85	1,96

5.6.2 Comparação dos resultados obtidos.

É freqüentemente necessária a comparação de dois métodos para determinar, se a variabilidade dos mesmos difere de forma significativa. Os ensaios de comparação devem prover dados suficientes para provar a sua equivalência em um determinado intervalo (United States Pharmacopeia, 2006). A comparação entre métodos por CLAE e eletroforese capilar é comum na literatura apesar de serem

métodos com princípios de separação diferentes, sendo as bases da separação por CE principalmente físicas de eletroforese e eletroosmose, dependendo principalmente da ionização das espécies, enquanto que às bases de CLAE são mais químicas (propriedades de absorção e distribuição) (HOLZGRABE, 2006) o que explica muitas das diferenças encontradas entre as duas técnicas quando aplicadas a uma mesma amostra (podendo variar até a ordem de eluição).

Para comparação de métodos a farmacopéia americana (United States Pharmacopeia, 2002) recomenda avaliar os parâmetros de precisão e exatidão. A comparação entre os dois métodos em questão, mostra que quanto aos parâmetros apresentados na validação ambos os métodos são considerados satisfatórios, pois a exatidão é próxima a 100%, e os valores de DPR para precisão são menores que 2%, como pode ser observado na tabela 20.

TABELA 20 – Resultados dos parâmetros do método apresentados para validação dos métodos de ECL e CLAE.

Parâmetro	EC			CLAE*		
	PYR	ISN	RIF	PYR	ISN	RIF
Linearidade- R^2	0,9996	0,9991	0,9994	<0,999	<0,999	<0,999
Exatidão(%)	98,78	99,10	99,54	98,55	98,51	98,56
Precisão –repetibilidade (DPR)	< 2 %			< 2 %		
Precisão intermediária (DPR)	< 2 %			< 2 %		

*Valores apresentados por CALLERI et al., 2002.

Uma vez que ambos os métodos possuem parâmetros semelhantes, a comparação deve ser feita analisando uma mesma amostra pelos dois métodos e comparando os resultados obtidos, quanto aos parâmetros de precisão e exatidão. Para esta comparação foi utilizado o teste F, recomendado para determinação de diferenças de precisão entre dois métodos analíticos ou dois analistas diferentes (CIENFUEGOS, 2005). Os valores de F encontrados foram menores que o valor de F tabelado ($F_{\text{tab}} = 9,28$ e $F_{\text{ISN}} = 1,15$, $F_{\text{RIF}} = 3,17$). Concluindo que os métodos possuem variâncias iguais, mostrando que não existe diferença significativa na precisão dos métodos comparados. Para a comparação da exatidão foi utilizado o

teste “t”, que permite conhecer em que intervalo de confiança se encontra a média obtida (CIENFUEGOS, 2005); os resultados encontrados ($t_{RIF}= 4,30$; $p>0,05$ e $t_{ISN}=2,77$; $p>0,05$) mostram que não há diferenças significativas entre os intervalos de confiança das médias encontradas a partir dos dois métodos utilizados. Desta forma os métodos para quantificação destes fármacos por ECL e por CLAE podem ser considerados semelhantes.

TABELA 21 – Resultados encontrados para exatidão e precisão utilizando ECL e CLAE para quantificação de ISN e RIF presentes na forma farmacêutica avaliada.

Parâmetro	EC		CLAE	
	ISN	RIF	ISN	RIF
Média	95,41	145,96	96,53	141,29
Exatidão (%)	95,41	97,3	96,53	94,19
Desvio padrão	1,66	1,55	1,78	2,77

A eletroforese capilar apresentou exatidão e precisão equivalentes às obtidas por CLAE, com uma redução considerável no tempo de análise, trazendo como principal vantagem o baixo custo de análise. A tabela 22 mostra alguns dados comparativos entre eletroforese capilar e cromatografia líquida. Analisando estes dados é possível evidenciar que as principais vantagens da EC frente à CLAE são menor tempo (sendo 1 hora menor desde o preparo da mostra até o fim da corrida) e custo por análise (sendo que a economia pode chegar a ser de 89% nas colunas e de 24 % no equipamento).

A principal diferença no custo das análises, considerando apenas os consumíveis, e assumindo que um capilar possui a mesma durabilidade do que uma coluna é o consumo de acetonitrila necessário para a análise por CLAE, já que consumíveis como viais, membranas filtrantes, e ponteiros, são comuns a ambos os métodos. Não foi considerado o consumo de solvente para estabilização da linha de base, pois este varia conforme as condições do aparelho.

TABELA 22 – Comparação de tempo e custos relativos por análise utilizando os métodos de ECL e CLAE, para quantificação dos fármacos isoniazida e pirazinamida, quando presentes em associação.

Parâmetro	EC	CLAE	REDUÇÃO %
Tratamento da amostra (min)	10	40	75
Tempo de Análise (min)	10	40	75
Consumo de solventes (R\$)	insignificante	3,64	100
Colunas (R\$)	130	1200	89,2
Equipamento (R\$)	95.000	125.000	24

6.0 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pode-se concluir que a eletroforese capilar livre (ECL) pode ser utilizada para quantificar os fármacos isoniazida, rifampicina e pirazinamida quando estes se encontram em associação ou isoladamente. As condições ótimas para esta separação eletroforética se deram ao se utilizar como eletrólito de fundo fosfato 40 mmol/ L a pH 9,0; capilar de sílica fundida, revestido de poliimida com 64,5 cm (56 cm efetivo) e 50 μ m de diâmetro interno, comprimento de onda para detecção de 269,5 nm e tempo de análise de 5 min, para uma diferença de potencial de 20kV, equivalente a uma corrente efetiva de 50 μ A.

O método desenvolvido atende os limites pré-estabelecidos para os parâmetros de validação de um método analítico quantitativo conforme normas internacionais, apresentando boa especificidade, linearidade com $R^2 > 0,999$, exatidão próxima a 100% e precisão com valores de DPR menores a 2%.

O método desenvolvido para eletroforese capilar apresentou exatidão e precisão equivalentes aos apresentados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), podendo ser utilizado na rotina indistintamente para a quantificação dos fármacos isoniazida, pirazinamida e rifampicina isoladamente ou em associação.

As principais vantagens do método por eletroforese capilar são: o reduzido tempo e baixo custo por análise. Outra vantagem desta técnica é o baixo consumo de solventes, minimizando os custos com tratamento de resíduos e impacto ambiental, podendo ser considerada então ecologicamente mais correta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEDO-VALENZUELA, M I; ESPINOSA-MANSILLA, A; MUNOZ, A de la PENA; CANADA-CANADA, F. Determination of antitubercular drugs by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 374, p. 432-436, 2002.

AGRAWAL, S; KAUR, K J; SINGH, I; BHADE, S R; KAUL, C L; PANCHANGULA, R. Assessment of bioequivalence of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide in a four drug fixed dose combination with separate formulations at the same dose levels. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 233, p. 169-177, 2002.

ALTRIA, K D. **Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Operation, and Applications**. V 52, Totowa: Humana Press, 1996.

ALTRIA, K D. Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 856, p. 443-463, 1999.

ALTRIA, K D; ELDER, D. Overview of the status and applications of capillary electrophoresis to the analysis of small molecules. **Journal of Chromatography A**, v. 1023, p. 1-4, 2004.

ANDRADE, J C de; CUSTODIO, R. **Eletroforese capilar**. Disponível em <http://www.chemkeys.com/bra/md/mds_11/mds_11.htm>. Acesso em 12 de jul. 2005.

BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº. 35 de 25 de fevereiro de 2003**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/35_03rdc.pdf> Acesso em 05 de mai. 2005.

ARGEKAR, A P; KUNJIR, S S; PURANDARE, K S. Simultaneous determination of rifampicin, isoniazid and pyrazinamid by high performance thin layer

chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, l. 11, p. 1645-1650, 1996.

BAKER, R D. **Capillary electrophoresis**. 1 ed. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1995

BHUTANI, H; SINGH, S; JINDAL, K C; CHAKRABORTI, A K. Mechanistic explanation to the catalysis by pyrazinamide and ethambutol of reaction between rifampicin and isoniazid in anti-TB FDCs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 892-899, 2005.

BLOOM, B R. **Tuberculosis: pathogenesis, protection and control**. Washington-DC: ASM press, 1994.

BRAUN M M; BADI, N; RYDER, R ; BAENDE, E; MUKADI,Y; NSUAMI, M; MATELA, B; WILAME, J C; KABOTO, M; HEYWARD, W. A retrospective cohort study of the risk of tuberculosis among women of childbearing age with HIV infection in Zaire **American review of respiratory disease**, v.143, l. 3, p. 501-4. 1991.

Braun M M; Badi N; Ryder R W; Baende E; Mukadi Y; Nsuami M; Matela B; Willame J C; Kaboto M; Heyward

CALLERI, E; LORENZI, E de; FURLANETTO, S; MASSOLINI, G; CACCIALANZA, G. Validation of a RP-LC method for the simultaneous determination of isoniazid, pyrazinamide and rifampicin in pharmaceutical formulation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 29, p.1089-1096, 2002.

QUEIROZ, S C do N de; JARDIM, I C S F. Em CHEMKEYS. Disponível em <http://www.chemkeys.com/bra/md/mds_11/elecap_4/fluele_2/fluele_2.htm> Acesso em 10 de mai. de 2005.

CHIN, J. **El control de las enfermedades transmisibles**. 17 ed. Washington-DC: Organización Pan-americana da Saúde, 2001. p. 646-659.

CHIS, V; PIRNAU, A; JURCA, T; VASISLESCU, M; SIMON, S; COZAR, O; DAVID, L. Experimental and DFT study of pyrazinamide. **Chemical Physics**, English, v. 316, p. 153-163, 2005.

CIENFUEGOS, F. **Estatística aplicada ao laboratório**. 1 ed..Rio de Janeiro: editora Interciência Ltda. 2005.

DYE, C. A retrospective cohort study of the risk of tuberculosis among women of child bearing age with HIV infection in Zaire. **Journal of The American Medical Association**, v. 282, l. 7, p. 677-86. 1999.

DUCATI, R G; RUFFINO-NETO, A; BASSO, L A; SANTOS, D S. The resumption of consumption. **Mem. Inst. Osvaldo Cruz**, v. 101, l. 7, p 607-715, 2006.

ELLARD, G.A. The evaluation of rifampicin bioavailabilities of fixed-dose combinations of anti-tuberculosis drugs: procedures for ensuring laboratory proficiency. **International Journal Tuberculosis and Lung Disease**, v.11, l. 3, p. S.322-324, Nov 1999

FARMACOPÉIA Brasileira. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1988. p iv-2, pt. 1

GAITONDE, C D; PATHAK, A C. Rapid and sensitive estimation of isoniazid, pyrazinamide and rifampicin in combined dosage form by reversed phase liquid chromatography. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.17, l. 9, p. 1201-1214, 1991.

GOICOCHEA, H C; OLIVIERI, A C. Simultaneous determination of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide in tablet preparations by multivariate spectrophotometric calibration. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 20, p. 681-686, 1999.

HOLZGRABE, U; BRINZ, D; KOPEC, S; WEBER, C; BITAR, Y. Why not using capillary electrophoresis in drug analysis? **Electrophoresis**, v.27, p 2283-2292, 2006.

ICH. **Text on Validation of Analytical Procedures Q2(R1)**. Disponível em <<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>> Acesso em 8 de jul. de 2005.

IGLESIA, A I de la; MORBIDONI, Y H R. Mecanismos de acción y de resistencia a rifampicina e Isoniazida en Mycobacterium tuberculosis: nueva información sobre viejos conocidos. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 38, l. 2, p 97-109, 2006.

IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry. Disponível em <<http://www.iupac.org/publications/compendium/S.html>>Acesso em 30 jun. de 2007.

KODA KIMBLE, M A, YOUNG, L Y; KRADJAN, W A; GUGLIEMO, B J. **Manual de Terapeutica Aplicada**. 7ª. ed. Rio de Janeiro-RJ: Guanabara Koogan S.A. 2005.

LANÇAS, F M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. São Paulo: RiMa, 2004.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 4 ed. Campinas-SP: Editora Átomo, 2002.

MANDELL, G L; PETRI JUNIOR, W. A. Fármacos Antimicrobianos. In: HARDMAN, J. G., *et.al.*. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9 ed. México DF: Mc. Graw-Hill Interamericana S.A., 1996.

MARTINDALE. **The complete drug reference**. 33 ed. London: Pharmaceutical Press, 2002.

The Merck Index. MERCK & CO INC.12 ed. N.J: Whitehouse station. 2000. 1 CD-ROM.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Epidemiologia da tuberculose no Brasil**. Disponível em <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/epidemio.pdf>> Acesso em 10 de set. de 2006.

OMS 2002. **QUADRO geral estratégico para reduzir o peso da TB/HIV**. Geneva: Organização Mundial da Saúde, 2002.

OMS. **WHO report 2003**. *Global Tuberculosis Control*. Geneva: Organização Mundial da Saúde. p 77-79, 2003 a.

OMS 2005. **Country profile**. Disponível em <http://www.who.int/globalatlas/predefinedreports/tb/PDF_Files/bra.pdf> Acesso em 10 de set. de 2006

PANCHAGNULA, R; AGRAWAL, S; ASHOKRAJ, Y; VARMA, M; SATEESH, K; BHARDWAJ, V; BEDI, S; GULATI, I; PARMAR, J; LAL KAUL, C; BLOMERG, B; FOURIE, B; ROSCIGNO, G; WIRE, R; LAING, R; EVANS, P; MOORE, T. Fixed dose combinations for tuberculosis: Lessons learned for clinical, formulation and regulatory perspective. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v. 26, I, 9, p. 703-721, 2004.

PEREIRA, E A; MICKE, G A; TAVARES, M F M. Determination of antiretroviral agents in human serum by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography Analysis**, v. 1091, p.169-176. 2005.

PRADO, M S A; STEPPE, M; TAVARES, F M; KEDOR-HAKMANN, E R M; SANTORO, M I R M. Comparisons of capillary electrophoresis and reversed-phase chromatography methodologies for determination of diazepam in pharmaceutical tablets. **Journal of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, v. 37, p. 273-279, 2005.

RIBANI, M; BOTOLLI, C B G; COLLINS, C H; JARDIM, I C S F; MELO, L F C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-789, 2004.

RILEY, L W. Drug-resistant tuberculosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 17, p. 442-S446, 1993.

SALFINGER, M; CROWLE, A J; RELLER, L B. Pyrazinamide and pyrazinoic acid activity against tubercle bacilli in cultured human macrophages and in the BACTEC system. **Journal of Infectious Diseases**, The, v. 162, l. 1, p201-207.1990 Jul.

SANTORO, M M I; PRADO, M S A; STEPPE, M; KEDOR-HAKMANN, E R M. Eletroforese capilar: teoria e aplicações na análise de medicamentos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 36, n. 1, p. 97-110, 2000.

SCIELO. **Eletroforese capilar.** Disponível em <<http://www.scielo.br/img/fbpe/qn/v26n1/14303f2.gif>> Acesso em 10, ago, de 2006.

SHARP, J. **Quality in the manufactured of medicines and other healthcare products**.3 ed. London: Pharmaceutical Press, 2000.

SHISHOO, C J; SHAH, S A; RATHOD, S S; SAVALE, J S; KOTECHA, J S; SHAH, P B. Stability of rifampicin in dissolution medium in presence of isoniazid. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 190, p. 109-123. 1999.

SINGH, S; MARIAPPAN, T T; SANKAR, N; SARDA, N; SINGH, B. A critical review of the probable reasons for the poor/variable bioavailability of rifampicin from anti-tubercular fixed-dose combination (FDC) products, and the likely solutions to the problem. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 228, p. 5-17. 2001.

TAKAYAMA, K; SCHNOES, H K; ARMSTRONG, E L; BOYLE, R W. Site of inhibitory action of isoniazid in the synthesis of mycolic acids in Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Lipid Research**, v. 16, l. 4, p. 308-317, Jul.1975.

TIMMINS, G S; MASTER, S; RUSNAK, F; DERETIC, V. Requirements for nitric oxide generation from isoniazid activation in vitro and inhibition of mycobacterial respiration in vivo. **Journal of Bacteriology**, v.186, l.16, p. 5427-5431, 2004.

UNITED STATES Pharmacopeia convention 25. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, p. 1534-1535, 2002.

UNITED STATES Pharmacopeia convention-drug information. **Drug information for the health care professional**. 23. ed. Thompson Micromedex, v 1. p. 1619-1626, 2314-2319, 2367-2385, 2003.

UNITED STATES Pharmacopeia convention 29. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2006.

VESSMAN, J. Selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, p 867 – 869, 1996.

VEUTHEY, J L. Capillary electrophoresis in pharmaceutical and biomedical analysis. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 381, n. 1, p. 93-95, 2005.

WADE, M M; ZHANG, Y. Anaerobic incubation conditions enhance pyrazinamide activity against *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, i. 8, p. 769-773, 2004.

WARREN, J R. **Mycobacterial infections**. In SHULMAN, **et al.**; The biological and clinical basis of *Infectious diseases*. 5 ed. Pennsylvania: W. B. Saunders Company. 1997.

WATSON D G. **Pharmaceutical analysis**: A textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemist. 1 ed. Toronto: Churchill Livingstone, p. 293-300, 1999.

WATZIG H. Capillary electrophoresis - a high performance analytical separation technique. **Clinical Chemistry & Laboratory Medicine**, v. 41, n. 6, p.724-738, 2003.

WEI S; SONG, G; LIN, J M. Separation and determination of norepinephrine, epinephrine and isoprenaline enantiomers by capillary electrophoresis in pharmaceutical formulation and human serum. **Journal of Chromatography A**, v 1098, i 1-2, p 166-171, 2005.